

**Beiträge zum molekularen Verständnis der Aggregation
und der Komplexierung von
GnRH-Antagonisten und GHRH-Analoga**

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

dem Bereich Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Master of Science Stephan Beil
geboren am 01. September 1986 in Freital

Gutachter: Herr Prof. Dr. Karl-Heinz van Pée
 Herr Prof. Dr. Jürgen Engel

eingereicht am: 13.04.2018

verteidigt am: 05.07.2018

Die Dissertation wurde in der Zeit vom April 2012 bis zum
Juli 2015 am Lehrstuhl für Allgemeine Biochemie angefertigt.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand an der Professur für Allgemeine Biochemie der Technischen Universität Dresden unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz van Pée in Kooperation mit der Aeterna Zentaris Inc. sowie Biscayne Pharmaceuticals Inc. im Zeitraum von April 2012 bis Juli 2015.

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere

Herrn Prof. Dr. K.-H. van Pée als Leiter der Professur und Betreuer dieser Arbeit für die stete Unterstützung meines Promotionsvorhabens, für die Schaffung der dafür notwendigen Rahmenbedingungen und die fachliche Begleitung in dieser Zeit,

Herrn Dr. Wolfgang Naumann als Leiter der Arbeitsgruppe und Betreuer der Arbeit für die Aufnahme in seine großartige Arbeitsgruppe, die kreative und innovative Arbeitsatmosphäre, die vielen anregenden Diskussionen und die fortwährende Unterstützung darin, eigene Ideen umzusetzen,

Herrn Prof. Dr. Jürgen Engel als Betreuer der Arbeit für die Unterstützung des Promotionsvorhabens und die maßgebliche Förderung der Kooperation mit Biscayne Pharmaceuticals Inc.,

Herrn Dr. Alexander Schneider für die herzliche und ungemein bereichernde Zusammenarbeit sowie die Möglichkeit, von seinen umfassenden Kenntnissen auf dem Gebiet des *Molecular Modelling*, über IT-Systeme und Proteinstrukturen zu profitieren,

B.Sc. Jana Bergmann, B.Sc. Clara Grundmann, B.Sc. Markus Göbel, B.Sc. Simon Schwarz, Erik Jankowski und vor allem M.Sc. Paul Körner, die durch ihr großes Engagement im Zuge ihrer Abschlussarbeiten wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit haben,

Herrn Prof. T. Wolff für die Unterstützung bei den TCSPC-Messungen, Frau Dr. M. Gruner und Herrn Dr. T. Lübken für die NMR-Messungen, Herrn Dr. P. Formánek für die TEM- und KryoTEM-Aufnahmen sowie Frau M.Sc. L. Richter und Herrn Dr. H. Börnick für die Möglichkeit, LC/MS-Experimente durchführen zu können,

Herrn Dr. T. Herrmann für die Zurverfügungstellung des Programmpakets *UNIO* und der Unterstützung bei der Übertragung auf die hier verwendeten Peptide, den NIH für das Programmpaket *XPLOR-NIH* sowie den Entwicklern der übrigen genutzten Software,

dem Beilstein Institut und seinen Mitarbeitern, insbesondere Herrn Dr. K. Kettner und Frau C. Keil für die finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Promotionsstipendiums - ohne welches die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wäre - und die anregenden Stipendiaten-Treffen,

Herrn Prof. Dr. A. V. Schally und den Mitarbeitern von Biscayne Pharmaceuticals Inc., insbesondere Herrn MS P. Goldstein und Frau MS & MBA L. Nair, für die spannende Kooperation zu GHRH-Analoga und die Zurverfügungstellung der entsprechenden Peptidproben,

Aeterna Zentaris Inc. für die Bereitstellung einiger GnRH-Analoga,

allen Mitarbeitern der Professur für Allgemeine Biochemie für die herzliche Atmosphäre und ständige Unterstützung,

sowie meiner Mutter DC Eva Beil für den starken Rückhalt, den sie mir in jeder Phase bietet, und für die stete Förderung und Bestärkung.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XI
1 EINLEITUNG	1
1.1 GnRH- und GHRH-Analoga	1
1.1.1 Das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) und seine Analoga	1
1.1.2 Erkenntnisse über das Aggregationsverhalten von GnRH-Antagonisten.....	5
1.1.3 Das Growth-Hormone-Releasing Hormone und seine Analoga	7
1.2 Peptidaggregation und Aggregationsinhibitoren	9
1.2.1 Amyloides Verhalten.....	9
1.2.2 Inhibitoren der amyloiden Peptidaggregation	11
1.3 Peptidstrukturanalytik.....	14
1.3.1 Untersuchung der Sekundärstruktur von Peptiden mittels Infrarot-Spektroskopie	14
1.3.2 Untersuchung der Struktur von Peptidaggregaten mithilfe struktur-sensitiver Sonden.....	16
1.3.3 Untersuchung von Peptidstrukturen mithilfe zweidimensionaler NMR-Spektroskopie	18
1.4 Aussichtsreiche Partnermoleküle in <i>drug-delivery</i> Systemen	27
1.4.1 Systeme mit Chitosan und anionischen Polyamino-säuren	27
1.4.2 Alginsäure und Hyaluronsäure	29
1.4.3 Tannine als potentielle Partnermoleküle	31
2 ZIELSTELLUNG	37
3 MATERIAL UND METHODEN	39
3.1 Chemikalien	39
3.1.1 Lyophilisierte Peptidhormone	39
3.1.2 Weitere Feststoffe.....	39
3.1.3 Lösungsmittel und Reagenzien.....	40
3.2 Geräte und Software	41
3.2.1 ATR-FTIR-Spektrometer	41
3.2.2 Chromatographie-Anlage zur Trennung der Gallotanninmischung aus <i>Rhus chinensis</i> an Sephadex LH-20	41
3.2.3 Isokratische HPLC-Anlage zur Peptidquantifizierung (1)	42
3.2.4 Isokratische HPLC-Anlage zur Peptidquantifizierung (2)	42
3.2.5 Gradienten-HPLC-Anlage zur Tanninanalytik (1).....	42
3.2.6 Gradienten-HPLC-Anlage zur Tanninanalytik (2).....	43
3.2.7 Semi-präparative HPLC-Anlage zur Tannintrennung.....	43
3.2.8 LC-MS/MS-Anlage	43
3.2.9 Fluoreszenz-Spektrometer	44
3.2.10 Single Photon Counting Cell für TCSPC-Messungen.....	44
3.2.11 UV/VIS-Spektrometer	44
3.2.12 NMR-Spektrometer	44
3.2.13 Transmissions-Elektronen-Mikroskop	44
3.2.14 Weitere Geräte	45
3.3 Bestimmung der GnRH-Antagonisten-Konzentration mithilfe isokratischer HPLC	45

3.3.1	Parameter der Bestimmungen	45
3.3.2	Kalibrierungen zur Peptidgehaltsbestimmung in Lösungen von GnRH-Antagonisten	46
3.4	ATR-FTIR-Spektroskopie	49
3.4.1	Geräteparameter	49
3.4.2	Messungen zur pH- und Zeitabhängigkeit der Sekundärstruktur-verteilung der GnRH-Antagonisten und des GHRH-Analogons, sowie Messungen an lyophilisierten Proben	50
3.4.3	Messungen an gefällten Peptid-Aggregaten und Komplexen	51
3.4.4	Bandenformanalyse zur Untersuchung der Sekundärstruktur von GnRH-Antagonisten	54
3.4.5	Bandenformanalyse zur Untersuchung der Sekundärstruktur von GHRH-Analoga	56
3.4.6	Bestimmung des Ethanol-Gehaltes von Ethanol-Wasser-Gemischen mittels ATR-FTIR-Spektroskopie	56
3.5	Statische Fluoreszenzspektroskopie an GHRH-Analoga	57
3.5.1	Geräteparameter	57
3.5.2	Durchführung der Messungen	57
3.6	Untersuchungen zur Aggregation des GHRH-Analogons mithilfe struktur-sensitiver UV- bzw. Fluoreszenz-Sonden	59
3.6.1	Probenpräparation	59
3.6.2	Untersuchungen zur Peptidaggregation mit der Fluoreszenz-Sonde Thioflavin T (ThioT)	60
3.6.3	Untersuchungen zur Peptidaggregation mithilfe der struktursensitiven Sonde 8-Anilinonaphthalin-1-sulfonsäure (ANS)	61
3.6.4	Untersuchungen zur Peptidaggregation mithilfe der struktursensitiven Sonde Kongorot (CR)	61
3.7	Kongorottitration von GnRH-Antagonisten	62
3.7.1	Untersuchungen zur Kongorotbindungskapazität von GnRH-Antagonisten	62
3.7.2	Kongorottitration in Gegenwart von potentiellen Inhibitoren der amyloiden Aggregation von GnRH-Antagonisten	63
3.8	Untersuchung des Phasenverhaltens von GnRH-Antagonisten	65
3.8.1	Ermittlung von Aggregationsphasendiagrammen von Cetrorelix und Ozarelix in binären Solvensgemischen aus Wasser und Ethanol bzw. aus Wasser und DMSO	65
3.8.2	Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie (TCSPC) an Teverelix-Lösungen	67
3.8.3	Doppelbrechungsuntersuchungen an Teverelix-Lösungen	68
3.8.4	Kristallisationsversuche von Cetrorelix-Aggregaten	68
3.8.4.1	pH-induzierte Kristallisation	68
3.8.4.2	Temperatur-induzierte Kristallisation	69
3.9	TEM- und Kryo-TEM-Untersuchungen an GHRH-Analoga	69
3.9.1	Probenpräparation	69
3.9.2	Durchführung der Messungen	70
3.10	NMR-Untersuchungen zur 3D-Struktur der Peptide	71
3.10.1	Probenpräparation und Spektrenakkumulation	71
3.10.2	Etablierung eines Software-Systems zur 3D-Strukturberechnung von GnRH- und GHRH-Analoga basierend auf <i>NOE-distance-restraints</i>	72
3.10.3	3D-Strukturberechnung und Visualisierung	75

3.11 Bestimmung des Phenolgehaltes von Tanninproben mithilfe eines FeCl₃-Assays.....	76
3.11.1 Durchführung der Bestimmung.....	76
3.11.2 Kalibrierung für verschiedene Tanninspezies	76
3.12 Chromatographische Trennung der Gallotanninmischung aus <i>Rhus chinensis</i> ..	78
3.12.1 Stufenelution an Sephadex LH-20.....	78
3.12.2 Semi-präparativen HPLC an einer RP-8-Säule	80
3.13 Methanolytische Gewinnung von Reinsubstanzen aus der Gallotanninmischung aus <i>Rhus chinensis</i>.....	81
3.13.1 Methanolytische Spaltung der Depsidbindungen und Aufarbeitung der Methanolyseprodukte	81
3.13.2 Semi-präparative HPLC an einer RP-8-Säule	82
3.14 Untersuchungen zu Besonderheiten der Methanolyse der Gallotanninmischung aus <i>Rhus chinensis</i>.....	84
3.14.1 Untersuchung des Phasenverhaltens von 1,2,3,4,6-Pentagalloyl-glukose (PGG) in Gegenwart von Gallussäure und Methylgallat.....	84
3.14.2 Analytische Alkoholysen der Tanninmischung mit Ethanol und <i>n</i> -Propanol	84
3.15 Analytische Gradienten-HPLC zur Untersuchung von Tanninfraktionen und -spezies	85
3.15.1 Parameter der Gradienten-HPLC	85
3.15.2 Kalibrierreihen für verschiedene, isolierte Tanninspezies	86
3.16 LC-MS/MS- und NMR-Untersuchungen an Tanninspezies und an Tanninfraktionen	86
3.16.1 Untersuchung der Molekül-Ion-Massen der Tanninfraktionen.....	86
3.16.2 Untersuchungen zur Struktur einer unbekannten Verbindung mit <i>m/z</i> = 680 aus der Methanolyse der Gallotanninmischung durch Fragmentierung und Tochterionen-Scan	87
3.16.3 NMR-Untersuchungen an den drei finalen Tanninspezies 3GG, 4GG und PGG ...	88
3.17 Untersuchungen an Komplexen von Polysacchariden mit GnRH-Antagonisten	89
3.17.1 Ubbelohde-Viskosimetrie.....	89
3.17.2 Fluoreszenzuntersuchungen zum Aggregationszustand von Cetorelix in Gegenwart von Polysacchariden	89
3.17.3 Untersuchung zur Präzipitation von Cetorelix-Amylose-Komplexen bei niedrigen pH-Werten.....	90
3.18 N-Acetylierung von Chitosanproben und Bestimmung des N-Acetylierungsgrades.....	90
3.19 Synthese von kovalent verbundenen Systemen aus Chitosan und Pentagalloylglukose.....	91
3.19.1 N-Succinylierung von Chitosan	91
3.19.2 Tanninylierung von N-Succinyl-Chitosan.....	92
3.20 Dialyseliberationsuntersuchungen an Formulierungen von GnRH-Antagonisten mit Partnermolekülen.....	92
3.20.1 Konstruktion der Dialyseliberationsapparatur.....	92
3.20.2 Probenpräparation.....	93
3.20.3 Durchführung der Messungen	97

3.20.4	Fluoreszenzspektroskopische Quantifizierung der zeitabhängigen Freisetzung von GnRH-Antagonisten	98
3.20.5	HPLC-basierte Quantifizierung der zeitabhängigen Freisetzung von GnRH-Antagonisten	99
3.20.6	HPLC-basierte Untersuchung der zeitabhängigen Freisetzung von Tanninspezies	99
4	ERGEBNISSE	101
4.1	Die Aggregation von GnRH-Antagonisten	101
4.1.1	Sekundärstrukturanalyse mithilfe der ATR-FTIR-Spektroskopie	101
4.1.1.1	Sekundärstrukturverteilung in Aggregaten von Cetorelix und einigen N-terminalen Fragmenten dieses GnRH-Antagonisten	101
4.1.1.2	Sekundärstrukturverteilung in Aggregaten von Ozarelix, Teverelix und einem Di- <i>Tertbutyl</i> -geschützten Syntheseintermediat von Cetorelix	105
4.1.1.3	Veränderungen der Sekundärstrukturverteilung von GnRH-Antagonisten in Abhängigkeit von Inkubationszeit und pH-Wert	109
4.1.2	Untersuchung der Aggregationsstufen und des Phasenverhaltens von GnRH-Antagonisten	111
4.1.2.1	Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie (TCSPC) an Teverelix-Lösungen	111
4.1.2.2	Konzentrationsabhängigkeit der Flüssigkristallbildung von Teverelix	113
4.1.2.3	Aggregationsphasendiagramme von Cetorelix	115
4.1.2.4	Aggregationsphasendiagramme von Ozarelix	118
4.1.3	Versuche zur Kristallisation von Cetorelix-Aggregaten	119
4.1.3.1	Kristallisationsinitiierung durch pH-Veränderung	119
4.1.3.2	Kristallisationsinitiierung durch Temperatur-Veränderung	120
4.1.4	NMR-Untersuchungen	125
4.1.4.1	Signalzuordnung von Cetorelix-Acetat in binären Solvensmischungen aus DMSO-d ₆ und D ₂ O	125
4.1.4.2	Signalzuordnung von Ozarelix-Acetat in DMSO-d ₆ und Konfigurationsisomerie der Peptidbindungen	129
4.1.4.3	Signalzuordnung von Teverelix-Acetat und Teverelix-Trifluoracetat in DMSO-d ₆	133
4.1.4.4	3D-Strukturen von Cetorelix-Acetat	138
4.1.4.5	3D-Strukturen von Ozarelix-Acetat	149
4.1.4.6	3D-Strukturen von Teverelix-Acetat und Teverelix-Trifluoracetat	152
4.1.4.7	DOSY-Untersuchungen an GnRH-Antagonisten	155
4.2	Die Aggregation eines GHRH-Analogons und Versuche zur Inhibierung dieses Prozesses	156
4.2.1	Sekundärstrukturanalyse mithilfe der ATR-FTIR-Spektroskopie	156
4.2.1.1	Sekundärstrukturverteilung in Abhängigkeit vom Aggregationszustand	156
4.2.1.2	Abhängigkeit der Sekundärstrukturverteilung in dem GHRH-Analogon in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und vom pH-Wert	159
4.2.2	Untersuchungen zur Abhängigkeit der Aggregation des GHRH-Analogons von der Peptidkonzentration, dem pH-Wert und dem NaCl-Gehalt	161
4.2.2.1	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen	161
4.2.2.2	Untersuchungen mit struktur-sensitiven Sonden	163
4.2.3	Untersuchungen der Wirkung potentieller Inhibitoren der Aggregation des GHRH-Analogons mit struktursensitiven Sonden	165
4.2.3.1	Der Einfluss von Bernsteinsäure, D/L-Weinsäure und L-Ascorbinsäure	165
4.2.3.2	Der Einfluss von Zitronensäure und Embonsäure/Benzylalkohol-Systemen	168
4.2.3.3	Der Einfluss von Gluconsäure	171

4.2.3.4	Vergleichende Untersuchungen zum Einfluss der Salzform des GHRH-Analogons (Acetat, Trifluoracetat, Hydrochlorid)	173
4.2.4	TEM- und Kryo-TEM-Untersuchungen	175
4.2.4.1	Untersuchungen zur Aggregatgestalt	175
4.2.4.2	Untersuchungen zum Einfluss potentieller Aggregationsinhibitoren	176
4.2.5	NMR-spektroskopische 3D-Strukturbestimmung	177
4.2.5.1	3D-Struktur des GHRH-Analogons nach Peptidsyntheseverfahren 1	177
4.2.5.2	3D-Struktur des GHRH-Analogons nach Peptidsyntheseverfahren 2	179
4.3	Trennung und Charakterisierung der Gallotanninmischung aus <i>Rhus chinensis</i> zur Gewinnung von Partnermolekülen für die Komplexierung von GnRH-Antagonisten	181
4.3.1	Chromatographische Trennung der Gallotanninmischung	181
4.3.1.1	Optimiertes Stufenelutionsverfahren an Sephadex LH-20	181
4.3.1.2	LC-MS/MS-Untersuchungen zur Zusammensetzung der aus der Stufenelution resultierenden Tanninfraktionen TaF1 - TaF4	184
4.3.1.3	Verfahrensoptimierung zur weiteren semi-präparativen HPLC-Trennung der aus der Stufenelution erhaltenen Tanninfraktionen TaF1 - TaF4	188
4.3.2	Methanolytische Gewinnung von Reinsubstanzen aus der Gallotanninmischung aus <i>Rhus chinensis</i>	191
4.3.2.1	Produkte der Methanolyse der Gallotanninmischung	191
4.3.2.2	LC-MS/MS-Untersuchungen zu der unbekannten Substanz mit $m/z = 680$ und zu abgeleiteten Alkoholylen mit Ethanol und <i>n</i> -Propanol	193
4.3.2.3	Untersuchungen zu den Aufarbeitungsschritten der Methanolyseprodukte	195
4.3.2.4	Gewinnung der finalen Tanninspezies durch semi-präparative HPLC	197
4.3.2.5	NMR-spektroskopische Strukturaufklärung der finalen Tanninspezies	199
4.3.2.6	Weiterführende Charakterisierung der finalen Tanninspezies	203
4.3.2.7	Phasenverhalten von 1,2,3,4,6-O-Pentagalloylglukose (PGG) in Gegenwart von Gallussäure und Methylgallat	208
4.4	Strukturuntersuchungen an Komplexen von GnRH-Antagonisten mit Partnermolekülen	210
4.4.1	ATR-FTIR-Spektroskopie	210
4.4.1.1	Komplexe mit ausgewählten Polysacchariden	210
4.4.1.2	Anti-amyloide Komplexe mit Poly-L-Glutamat und der Gallotanninmischung aus <i>Rhus chinensis</i>	214
4.4.1.3	Komplexe mit Tanninfraktionen	218
4.4.2	Struktureffekte in Formulierungen von GnRH-Antagonisten mit Polysacchariden	223
4.4.2.1	pH-Abhängigkeit der Präzipitation von Amylose-Cetorelix-Komplexen	223
4.4.2.2	Viskosität von Cetorelix und verschiedenen Polysacchariden	224
4.4.2.3	Der Einfluss von Stärkekomponenten auf den Aggregationszustand von Cetorelix	225
4.4.3	Untersuchungen zur Aggregations-inhibierenden Wirkung mithilfe der Kongorottitration	228
4.4.3.1	Entwicklung der Kongorottitration zur Quantifizierung des Amyloidanteiles von GnRH-Antagonisten	228
4.4.3.2	Kongorottitration von Cetorelix in Gegenwart von Poly-L-Glutamat und der Gallotanninmischung in Abhängigkeit von den Formulierungsbedingungen	231
4.4.3.3	Kongorottitration von Cetorelix in Gegenwart von Teilfraktionen der Tanninfraktionen TaF1 - TaF4	235

4.4.3.4	Kongorottritation von Ozarelix in Gegenwart von Teilfraktionen der Tanninfraktionen TaF1 - TaF4.....	236
4.4.3.5	Kongorottritation von Teverelix in Gegenwart von Teilfraktionen der Tanninfraktionen TaF1 - TaF4.....	237
4.4.3.6	Kongorottritation von GnRH-Antagonisten in Gegenwart der methanolytisch gewonnenen finalen Tanninspezies.....	239
4.4.4	Untersuchungen zur Selektivität der Interaktion von Cetrorelix mit Tanninspezies.....	240
4.4.4.1	Interaktionsstudien mit den Tanninfraktionen TaF1 und TaF2	240
4.4.4.2	Interaktionsstudien mit Methanolyseprodukten.....	242
4.5	Untersuchungen zum Freisetzungsverhalten der generierten Komplexe mithilfe der Dialyseliberationsapparatur	244
4.5.1	Evaluierung der entwickelten Dialyseliberationsapparatur	244
4.5.1.1	Charakterisierung der entwickelten Dialyseliberationsapparatur mithilfe der niedermolekularen Modells substanz Tyrosin.....	244
4.5.1.2	Charakterisierung für reale Peptidsysteme unter Verwendung von Cetrorelix-Lösungen	246
4.5.2	Liberationsexperimente mit Polysacchariden als Partnermoleküle	247
4.5.2.1	Liberationsuntersuchungen mit Chitosanen als kationische Polysaccharide	247
4.5.2.2	Liberationsuntersuchungen mit Stärkekomponenten als neutrale Polysaccharide.....	250
4.5.2.3	Liberationsuntersuchungen mit Alginat und Hyaluronat als anionische Polysaccharide	252
4.5.3	Liberationsexperimente mit der ungetrennten Gallotanninmischung und den methanolytisch gewonnenen finalen Tanninspezies.....	254
4.5.3.1	Freisetzungsexperimente mit der ungetrennten Gallotanninmischung aus <i>Rhus chinensis</i> in Abhängigkeit vom NaCl-Gehalt	254
4.5.3.2	Freisetzungsexperimente mit den methanolytisch gewonnenen finalen Tanninspezies.....	256
4.5.4	Liberationsexperimente mit chromatographisch gewonnenen Tanninfraktionen.....	266
4.5.4.1	Freisetzungsexperimente mit den Teilfraktionen der Tanninfraktion TaF3	266
4.5.4.2	Freisetzungsexperimente mit den Teilfraktionen der Tanninfraktion TaF4	273
4.5.5	Liberationsexperimente mit kovalent und nicht-kovalent verbundenen Systemen aus Chitosan und Tanninspezies	274
4.5.5.1	Freisetzungsexperimente mit nicht-kovalent verbundenen Systemen	274
4.5.5.2	Freisetzungsexperimente mit kovalent verbundenen Systemen	277
5	DISKUSSION	281
5.1	Aggregation von GnRH-Antagonisten und des GHRH-Analogons	281
5.1.1	Monomerkonformationen von GnRH-Antagonisten	281
5.1.2	Initiale Schritte der Aggregatbildung von GnRH-Antagonisten und Ausbildung der amyloid-typischen Sekundärstruktur	285
5.1.3	Fibrillenbildung und Phasenverhalten von GnRH-Antagonisten	294
5.1.4	Aggregationscharakteristika des GHRH-Analogons und verallgemeinerungsfähige Aspekte	297
5.2	Inhibitoren der Aggregation von GnRH-Antagonisten und des GHRH-Analogons.....	300
5.2.1	Inhibitoren der Aggregation von GnRH-Antagonisten.....	300
5.2.2	Aufklärung struktureller Charakteristika der untersuchten Tannine.....	302
5.2.3	Chromatographisches Trennverhalten der Tanninfraktionen	307

5.2.4	Besonderheiten des Löslichkeitsverhalten der Methanolyseprodukte.....	309
5.2.5	Zusammenhänge zwischen Tanninstruktur und anti-amyloiden Effekten auf GnRH-Antagonisten.....	311
5.2.6	Inhibitoren der Aggregation des GHRH-Analogons	315
5.3	Beeinflussung des Liberationsverhaltens von GnRH-Antagonisten durch Partnermoleküle	318
5.3.1	Entwicklung einer Dialyseliberationsapparatur zur Untersuchung des Freisetzungsverhaltens mobiler Peptidspezies	318
5.3.2	GnRH-Antagonist-Komplexe mit Polysacchariden	321
5.3.3	Komplexe mit Tanninfraktionen und -spezies.....	324
5.3.4	Komplexe mit kovalenten und nicht-kovalenten Formulierungen aus Chitosan und Tanninspezies	327
6	ZUSAMMENFASSUNG	331
7	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	337
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	357
9	TABELLENVERZEICHNIS	377
10	ANHANG	381
10.1	Zuordnungstabellen der ¹H-, ¹³C- und ¹⁵N-NMR-Signale	381
10.1.1	Zuordnungstabellen für Cetorelix	381
10.1.2	Zuordnungstabellen für Ozarelix.....	385
10.1.3	Zuordnungstabellen für Teverelix	388
10.2	Verteilung und Kontakt-Übersichten von NOE restraints.....	391
10.2.1	Verteilung der <i>NOE distance restraints</i> für Cetorelix-Acetat in DMSO-d ₆ /D ₂ O (45/55 (v/v))	391
10.2.2	Verteilung der <i>NOE distance restraints</i> für Ozarelix-Acetat in DMSO-d ₆ bei einer <i>trans</i> -Peptidbindung zwischen Ser ⁴ & Tyr(Me) ⁵	392
10.2.3	Verteilung der <i>NOE distance restraints</i> für Ozarelix-Acetat in DMSO-d ₆ bei einer <i>cis</i> -Peptidbindung zwischen Ser ⁴ & Tyr(Me) ⁵	393
10.2.4	Verteilung der <i>NOE distance restraints</i> für Teverelix-Trifluoracetat in DMSO-d ₆	394
10.2.5	Verteilung der <i>NOE distance restraints</i> für Teverelix-Acetat in DMSO-d ₆	395
10.3	Statistische Werte der 3D-Strukturberechnung des GHRH-Analogons nach Peptidsyntheseverfahren 2.....	396
10.4	Zuordnungstabellen für die ¹H-NMR-Spektren der Glukoseeinheiten von 4GG und PGG.....	397
10.5	ATR-FTIR-Spektren von Teverelix-Komplexen mit Tanninfraktionen.....	398

Abkürzungsverzeichnis

3GG	Trigalloylglukose
4GG	Tetragalloylglukose
5GG	Pentagalloylglukose
ANS	Ammonium-1,8-anilino-naphthalinsulfonat
APP	Amyloid-Precursor Protein
ATNOS	Automated NOESY Peak Picking
ATR	Attenuated Total Reflectance
A β	Amyloid- β -Peptide
BMRB	Biological Magnetic Resonance Bank
BPH	Benigne Prostata-Hyperplasie
BPP-LED	Bipolar Pulse Pair-Longitudinal Eddy-Current Delay
BPTI	Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor
BSE	Bovine Spongiform Encephalopathy
cac	critical aggregation concentration
CAD	Collisionally Activated Dissociation
CANDID	Combined Automated NOE Assignment and Structure Determination Module
CE	Collision Energy
CEM	Channel Electron Multiplier
CEP	Cell Entrance Potential
CHARMM	Chemistry at Harvard Molecular Mechanics
cmc	critical micellar concentration
COSY	Corellation Spectroscopy
CR	Kongorot
Cx	Cetrorelix
CXP	Cell Exit Potential
DAD	Diode-Array Detector
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer
DFT	Dichte-Funktional-Theorie
DG	Distance Geometry
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DMSO(-d ₆)	Dimethylsulfoxid (-hexadeutert)
DOSY	Diffusion-Ordered Spectroscopy
DP	Declustering Potential

Abkürzungsverzeichnis

DTGS	Deuterated Triglycine Sulfate (-Detektor)
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid
EGCG	(-)-Epigallocatechingallat
EP	Entrance Potential
FID	Free Induction Decay
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
FTIR	Fourier Transform-Infrarot-Spektroskopie
GAE	Gallic Acid Equivalents
GH	Growth Hormone
GHRH	Growth Hormone-Releasing Hormone
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GRAS	Generally Recognized as Safe
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOHAHA	Homonuclear Hartmann-Hahn Spectroscopy
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IGF-I/-II	Insulin-like Growth Factor-I/-II
INEPT	Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry
LH	Luteinisierendes Hormon
LHRH	Luteinisierendes Hormon-Releasing-Hormon
lmw	low molecular weight
M*	Methanolyseproduktmischung
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
MD	Molecular Dynamics
MLEV(-17)	M. Levitt's CPD sequence(-17)
MS	Massenspektrometrie
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NIH	National Institutes of Health (USA)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOAEL	No-Observed-Adverse-Effect Level
NOE	Nuclear Overhauser Effect

NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PDB	Protein Data Bank
PGG	1,2,3,4,6-O-Pentagalloyl- β -D-Glukose
PGSE	Pulsed Gradient Spin Echo
PLS	Partial Least Squares
PrP ^C	Prion Protein Cellular
PrP ^{Sc}	Prion Protein Scrapie
PVC	Polyvinylchlorid
RHAMM	Receptor for Hyaluronan Mediated Motility
RMD	Restrained Molecular Dynamics
RMSD	Root-Mean-Square Deviation
ROESY	Rotating-frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
SIB	Schweizer Institut für Bioinformatik
SV ₁	Splice-Variante 1 des humanen GHRH-Rezeptors
TaF1-4 Peak 1-3	via semipräparativer HPLC gewonnene Teilfraktionen 1-3 aus TaF1-4
TaF1-4	via Chromatographie an Sephadex LH-20 gewonnene Tanninfraktionen 1-4
TaNSCS 1-3	Tanninylierte N-Succinyl-Chitosane 1-3
TCSPC	time-correlated single photon counting
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
ThioT	Thioflavin T
TIC	Total Ion Current
TICT	Twisted Intramolecular Charge Transfer
TMS	Tetramethylsilan
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TOF	Time-Of-Flight(-Detektor)
TTR-FAP	Transthyretin-assoziierte familiäre Amyloid-Polyneuropathie
UV/vis	ultravioletter und visueller Spektralbereich
VB-Theorie	Valenz-Bindungs-Theorie
XIC	Extracted-Ion Current
β G	β -Glukogallin

1 Einleitung

1.1 GnRH- und GHRH-Analoga

1.1.1 Das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) und seine Analoga

Das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) und seine synthetischen Analoga stehen seit Jahrzehnten im Fokus der Arbeitsgruppe "Wirkungsmodifizierung von Peptidhormonen" am Lehrstuhl für Allgemeine Biochemie der TU Dresden, weshalb bereits mehrere ausführliche Zusammenstellungen des diesbezüglichen Forschungsstandes existieren. Für eine umfassende Beschäftigung mit dieser Thematik sei daher auch auf die aktuellen Darstellungen von BEIL, 2012(1), HEMPELT, 2012 und SCHAMBERGER, 2014 verwiesen.

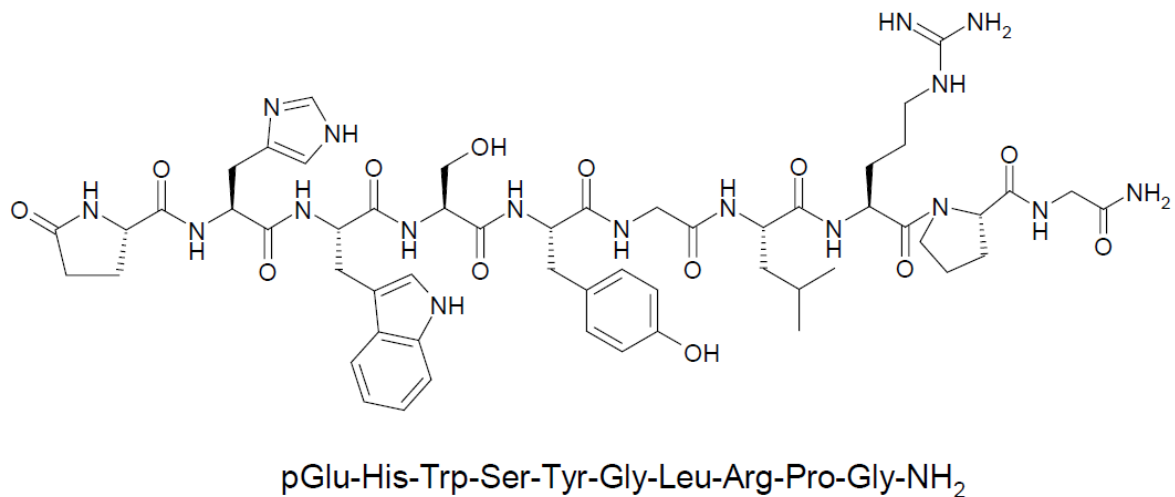


Abb. 1: Primärstruktur von GnRH-I [Lang, 2005]

Die frühe Erforschung der Peptidhormonproduktion des Gehirns ist stark mit der Arbeitsgruppe um Andrew V. Schally verbunden, der für seine Leistungen auf diesem Gebiet 1977 den Nobelpreis für Medizin erhielt. 1971 gelang ihm die Erstisolierung und Charakterisierung des im Hypothalamus gebildeten Dekapeptides GnRH, welches häufig alternativ auch als Luteinisierendes Hormon-Releasing-Hormon (*LHRH*) bezeichnet wird [Schally et al., 1971; Matsuo et al., 1971]. Neben dem initial entdeckten Peptid GnRH-I, dessen Struktur in Abb. 1 dargestellt ist, sind bisher zwei weitere humane Varianten (GnRH-II & GnRH-III) bekannt, welche sich in den Positionen 5, 7 und 8 sequentiell unterscheiden [Fernald & White, 1999].

GnRH-I wird vom Hypothalamus pulsatil in Abständen von 60 - 120 min in die Eminentia mediana sekretiert [Vijayan & Variyar, 1999], bindet an spezifische, membranständige Rezeptoren der Adenohypophyse [Kutscher et al., 1997] und induziert dadurch Bildung und Freisetzung der Peptidhormone LH (*Luteinisierendes Hormon*) und FSH (*Follikelstimulierendes Hormon*) und durch deren Wirkung die Sekretion von Sexualsteroiden [Huire & Lambalk, 2001]. Die physiologische Wirkung von GnRH-I klingt nach der Freisetzung aufgrund der sehr kurzen Plasmahalbwertszeit von 2 - 5 min schnell wieder ab [Felberbaum & Karck, 1997] und die Länge des Zeitintervalles bis zur folgenden GnRH-I-Ausschüttung steht in direktem Zusammenhang zum LH/FSH-Verhältnis in der Folgestufe der beschriebenen Hormon-Kaskade [Vijayan & Variyar, 1999]. Erfolgt hingegen durch eine künstliche, kontinuierliche Zuführung von GnRH oder einem seiner agonistischen Analoga eine Dauerstimulation der GnRH-Rezeptoren, wird nach einer anfänglich verstärkten LH- und FSH-Ausschüttung (*flare-up*) eine längerfristige Desensibilisierung gegenüber GnRH-I aufgrund einer Verringerung der entsprechenden Rezeptoren auf der Oberfläche der Adenohypophyse beobachtet (*down regulation*) [Felberbaum et al., 1998; van Loenen et al., 2002].

Pharmazeutisch lässt sich das native GnRH-I infolge seiner geringen Plasmahalbwertszeit nicht einsetzen, was bereits zu einem frühen Zeitpunkt die systematische Entwicklung synthetischer Analoga in den Fokus rückte. Im Zuge der Synthese und Untersuchung tausender GnRH-Analoga konnten umfangreiche Erkenntnisse über die Bedeutung der einzelnen Aminosäuren an bestimmten Positionen innerhalb der Sequenz gewonnen werden [Schally et al., 2001].

So ist der Einbau einer sterisch anspruchsvollen, D-konfigurierten Aminosäure in Position 6 unabdingbar, um die notwendige Erhöhung der Plasmahalbwertszeit sicher zu stellen, da die Peptidbindung zwischen Position 6 und 7 den bevorzugten Angriffspunkt für die proteolytische Spaltung *in vivo* darstellt [von Angerer, 1996]. Gleichzeitig beeinflusst die an dieser Position vorhandene Aminosäure die Rezeptoraffinität erheblich [Kutscher et al., 1997; Fromme et al., 2001]. Es zeigte sich jedoch, dass der Einbau von D-Arginin in Position 6 zu einem erhöhten anaphylaktischen Potential führt, was mit der unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen Seitenkette der Aminosäure in Zusammenhang gebracht wurde [Hahn et al., 1985; Nestor et al., 1992]. Dieses Problem konnte durch den Einsatz einer Aminosäure mit einer polaren, jedoch ungeladenen Seitenkette, wie z.B. D-Citrullin oder D-Homocitrullin, behoben werden [Bajusz et al., 1988; Kleemann et al., 1991].

Weitere Modifikationen in den Positionen 1 und 10 beeinflussen die Rezeptoraffinität, wohingegen die Aminosäuren in Position 2 und 3 von maßgebender Bedeutung für die bewirkte LH- und FSH-Freisetzung sind und daher deren Wahl über den agonistischen oder antagonistischen Effekt des konkreten Analogons entscheidet [Fluker, 2000; Hövelmann et al., 2002].

Die hauptsächlichen Anwendungsgebiete von GnRH-Analoga liegen zum einen in der Reproduktionsmedizin [Olivennes et al., 1998; Albano et al., 2000; Janát-Amsbury et al., 2009] und zum anderen in der Therapie sexualhormon-abhängiger Tumore [Possinger et al., 1998; Marquardt & Schäfer, 1994]. Im Zusammenhang mit letztgenanntem Gebiet wird neben der systemischen Wirkung auch eine direkte Beeinflussung von Tumorzellen vermutet, da in einigen Tumorzelllinien eigene GnRH-Rezeptoren nachgewiesen wurden [Huire & Lambalk, 2001; Maudsley et al., 2004].

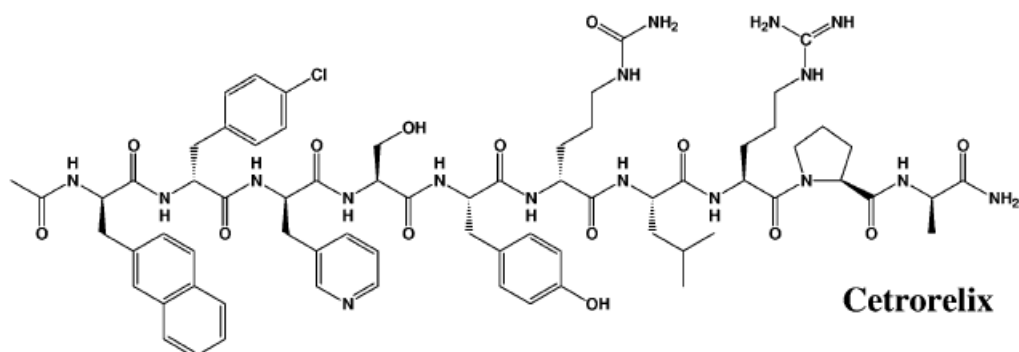
In in einer Vielzahl pharmazeutisch relevanter Anwendungsmöglichkeiten ist eine Unterdrückung der GnRH-Wirkung notwendig. Um diesen Effekt mithilfe von GnRH-Agonisten zu erreichen, wird die beschriebene Desensibilisierung infolge einer kontinuierlichen Stimulierung der Rezeptoren ausgenutzt, was jedoch einerseits eine erhebliche Vorlaufzeit von 2 - 3 Wochen vor Eintritt des erwünschten Effektes mit sich bringt [Janssens et al., 1998] und andererseits aufgrund des damit einhergehenden *flare up*-Effektes insbesondere im Rahmen der Tumorthherapie zunächst das Risiko einer Verschlechterung der Krankheitssituation erhöht. Die Behandlung mit GnRH-Agonisten geht häufig mit menopausalen Nebenwirkungen und einem gesteigerten Risiko für ein ovarielles Hyperstimulationssyndrom einher [Diedrich et al., 2001; Howles, 2002].

Der Einsatz von GnRH-Antagonisten stellt demgegenüber einen deutlich risiko- und nebenwirkungsärmeren Ansatz dar. Durch kompetitive Bindung an die GnRH-Rezeptoren wird die erwünschte Suppression der Hormonwirkung ohne Vorlaufzeit realisiert und kann gleichsam bei Absetzen der Medikation zügig wieder regeneriert werden [Tarlatis & Kolibianakis, 2007], wobei allerdings bei längerfristiger Applikation hoher Dosen von GnRH-Antagonisten die Einstellung einer allmählichen Desensibilisierung zu verzeichnen war [Pinski et al., 1996; Halmos et al., 2000; Kovacs et al., 2001].

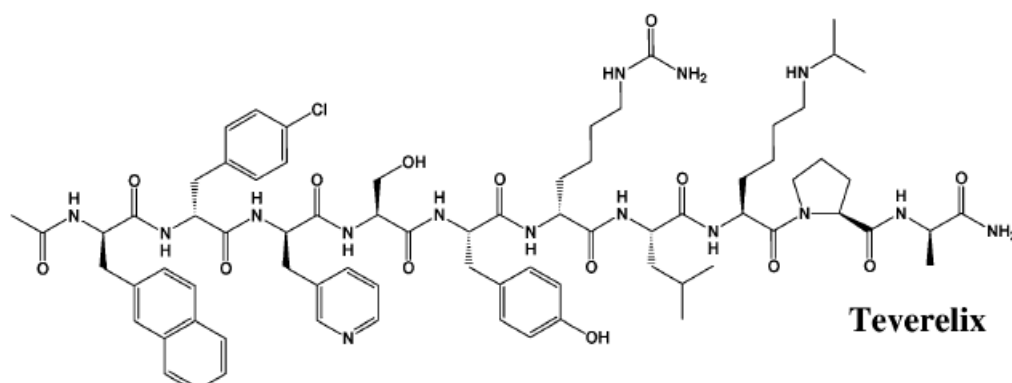
Die für die vorliegende Arbeit relevanten GnRH-Antagonisten sind in Abb. 2 abgebildet. Cetrorelix wurde als erster GnRH-Antagonist 1999 von der ASTA Medica AG (später Aeterna Zentaris GmbH) für den Einsatz in der Reproduktionsmedizin auf den Markt gebracht (CetrotideTM) und in der Folge besonders ausführlich untersucht. In Hinsicht auf einen möglichen Einsatz in der Tumorthherapie wurden für Cetrorelix eine

1 Einleitung

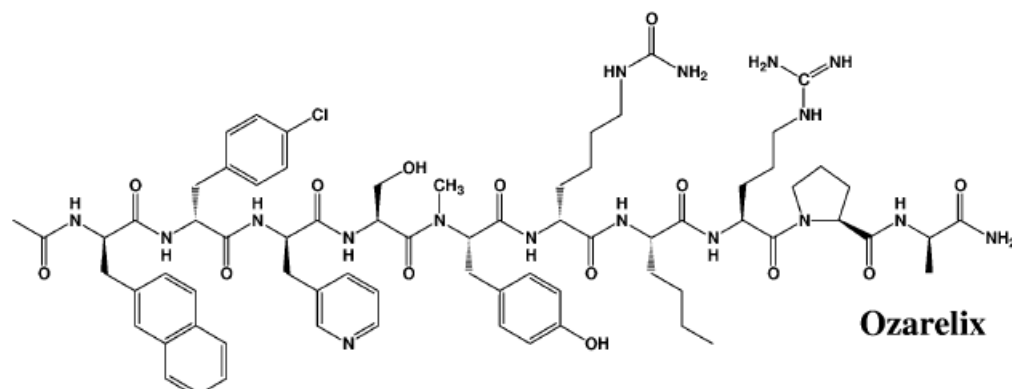
wachstumsinhibierende Wirkung auf maligne Tumore beschrieben [Horvath et al., 1995; Jungwirth et al., 1997; Lamharzi et al., 1998] sowie positive Effekte bei der Behandlung benigner Tumorerkrankungen, wie etwa BPH (*Benigne Prostate Hyperplasie*) [Engel et al., 2007; Debruyne et al., 2008] oder Endometriose [Küpker et al., 2002], konstatiert. Teverelix entstammt derselben, sogenannten 3. Wirkstoffgeneration von GnRH-Antagonisten wie Cetrorelix und wurde intensiv in Hinblick auf einen möglichen Einsatz zur Therapie von BPH [Maclean et al., 2008] und fortgeschrittenem Prostatakarzinom [Maclean et al., 2006] untersucht.



Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4Cl)-D-Pal(3)-Ser-Tyr-D-Cit-Leu-Arg-Pro-D-Ala-NH₂



Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4Cl)-D-Pal(3)-Ser-Tyr-D-Hcit-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala-NH₂



Ac-D-Nal(2)-D-Phe(4Cl)-D-Pal(3)-Ser-NMe-Tyr-D-Hcit-Nle-Arg-Pro-D-Ala-NH₂

Abb. 2: Darstellung der Primärstrukturen der GnRH-Antagonisten Cetrorelix, Teverelix und Ozarelix [Schneider et al., 2010]

Vertreter der 3. Generation von GnRH-Antagonisten zeigen ein ausgeprägtes Aggregationsverhalten unter physiologischen Konditionen (vgl. 1.1.2), was eine erhebliche Beeinträchtigung der Bioverfügbarkeit mit sich bringt. Diesem Phänomen versuchte man durch Einbringung einer Rückgratmethylierung in der aktuellen 4. Wirkstoffgeneration entgegenzuwirken. Ozarelix, als Vertreter dieser 4. Generation, wurde mit dem Ziel eines möglichen Einsatzes zur Behandlung von BPH untersucht [Denes et al., 2007]. Es erreichten lediglich Cetrorelix und Ganirelix im Bereich der IVF sowie Degarelix (4. Generation) zur Behandlung von Prostata carcinoma die Zulassung zum therapeutischen Einsatz.

1.1.2 Erkenntnisse über das Aggregationsverhalten von GnRH-Antagonisten

Die erstmals von BAJUSZ ET AL., 1988 entwickelten GnRH-Antagonisten der 3. Generation, zu welchen auch Cetrorelix und Teverelix gehören, zeigen eine hohe Rezeptoraffinität und verfügen über kein anaphylaktisches Potential, sodass diese Wirkstoffgeneration für einen pharmazeutischen Einsatz prinzipiell geeignet ist. Es zeigte sich aber recht bald, dass diese Peptide in wässrigen Systemen zu einer intensiven Aggregat- und Gelbildung neigen, was frühzeitig mit der N-terminalen, stark hydrophoben Sequenz Ac-D-Nal(2)¹-D-Phe(4Cl)²-D-Pal(3)³ in Verbindung gebracht wurde. Da dieser Sequenzbereich jedoch für die Wirkung unabdingbar ist, wurden Versuche unternommen, dieses Problem beispielsweise durch eine Applikation in unpolaren Solventien in den Griff zu bekommen [Nestor et al., 1992]. Aufgrund anhaltender Probleme, wie z.B. Gelbildungen während der Injektion und große Bedenken bezüglich der erzielten Bioverfügbarkeit, welche auch mit der Einführung einer Rückgratmethylierung in der 4. Wirkstoffgeneration nicht grundlegend behoben werden konnten [Goerres et al., 2002], rückte die Untersuchung der Grundlagen der auftretenden Aggregation zunehmend in den Mittelpunkt der Forschung.

Aus der Summe der bisher mithilfe zahlreicher analytischer Methoden gewonnenen Erkenntnisse ergibt sich in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration ein mehrstufiger Aggregationsprozess, der zu hoch geordneten Strukturen führt [Beil, 2012(1)]. Da die auftretende Aggregation stark von den konkreten Solvenskonditionen abhängt und die Einstellung des Gleichgewichtszustandes mehrere Tage in Anspruch nimmt [Murgas, 1997; Lang, 1998], wurden die meisten diesbezüglichen Studien standardisiert nach 7-tägiger Inkubation in 10 mM Ammoniumacetat-Lösung (pH 7,0) durchgeführt.

Für Cetrorelix lässt sich unter diesen Bedingungen bereits für Peptidkonzentration unterhalb von 0,006 mg/ml mithilfe zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie (TCSPC: *Time-correlated*

single photon counting) die allmähliche Ausbildung intermolekularer β -Faltblattstrukturen nachweisen [Beil, 2012(1)]. Bei Überschreiten dieser Peptidkonzentration indizieren dieselben TCSPC-Messungen den Beginn einer hydrophoben Assoziation unter Beteiligung der Ac-D-Nal(2)¹-Reste und eine Zunahme der β -Faltblattanteile. Weiterhin zeigen massenspektrometrische Untersuchungen eine erhöhte Stabilität von dimeren und tetrameren Peptidaggregaten in diesem Konzentrationsbereich, welche durch intensive polare Interaktionen miteinander verbunden sind [Hempelt, 2012].

Bei Erreichen einer als *cac* (*critical aggregation concentration*) bezeichneten Konzentration, welche für Cetrorelix mit 0,041 mg/ml, für Teverelix mit 0,050 mg/ml und für Ozarelix mit 0,170 mg/ml bestimmt wurde [Schneider et al., 2010], ändern sich zahlreiche physikalische Eigenschaften, sodass ihre Bestimmung sowohl mittels intrinsischer und extrinsischer Fluoreszenzspektroskopie [Lang, 2005; Schneider et al., 2010], Quarzmikrowaage [Kick, 2007], MALDI-TOF-MS [Hempelt, 2012], als auch mit TCSPC [Beil, 2012(1)] beschrieben ist. Basierend auf der bei diesem Übergang beobachteten Veränderung des intrinsischen Fluoreszenz-Emissionsspektrums der Peptide leiteten SCHNEIDER ET AL., 2010 ab, dass bei Überschreiten der *cac* eine konzertierte Wasserstoffbrücken-Ausbildung der phenolischen OH-Gruppe von Tyr⁵ zu einer adäquaten Akzeptor-Gruppierung stattfindet.

Oberhalb der *cac* lassen sich mit verschiedenen bildgebenden Verfahren fibrilläre Aggregatstrukturen beobachten, wobei bisher sowohl Laserrastermikroskopie [Eichler, 2007] als auch Transmissionselektronenmikroskopie [Kick, 2007; Maji et al., 2008] Verwendung fanden. Mithilfe der struktur-sensitiven Sonde Thioflavin T (*ThioT*) konnte für einzelne GnRH-Analoga ein amyloider Charakter belegt werden [Maji et al., 2008].

Die gebildeten Fibrillen ordnen sich bei sehr hohen Peptidkonzentrationen in lyotropen Mesophasen an, was erstmals durch POWELL ET AL., 1994 empirisch an wässrigen Lösungen des GnRH-Antagonisten Deterelix bei Konzentrationen von 10 - 20 mg/ml erkannt und von EICHLER, 2007 auf der Basis isothermer Titrationskalorimetrie für Cetrorelix und Ozarelix vermutet wurde. Gleichzeitig suggerierten die Ergebnisse von S. Eichler, dass für Teverelix keine lyotrope Mesophase zu erwarten sei. Mithilfe polarisationsmikroskopischer Untersuchungen konnte für Cetrorelix die Bildung einer nematischen Mesophase in 0,1 M Essigsäure bei Überschreiten einer Peptidkonzentration von 4 mg/ml nachgewiesen werden, wohingegen der entsprechende Phasenübergang für Ozarelix erst bei 8 mg/ml auftritt [Beil, 2012(1)].

Um den initialen Schritt dieses Aggregationsprozesses verstehen zu können, ist eine detaillierte Kenntnis der Konformation des Peptidmonomeres zu Beginn der Aggregation

erforderlich. Mit diesem Ziel wurden von MÜLLER ET AL., 1994 NMR-spektroskopische Untersuchungen an Cetorelix in verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt. Dabei konnten jedoch in den meisten Lösungsmitteln, wie z.B. in DMSO-d₆, wegen fehlender *long-range*-Kontakte keine Indizien für eine Vorzugsstruktur gefunden werden. In Tensid-Emulsionen mit SDS wurden hingegen zahlreiche Kontakte beobachtet, die nicht mit einer einzelnen Konformation zu vereinbaren sind, sodass auf eine Strukturberechnung verzichtet wurde.

Im Gegensatz dazu könnten für GnRH-Agonisten, wie beispielsweise Leuprolid, NMR-spektroskopisch klar definierte Vorzugskonformationen in DMSO-d₆ bestimmt werden, welche sich stets durch eine Turn-Struktur am C-terminalen Ende der Sequenzen auszeichnen, welche für einzelne Vertreter um einen zweiten Turn im Bereich der N-terminalen Reste 1-4 ergänzt wird [Nikiforovich & Marshall, 1993; Pappa et al., 2010]. Diese Ergebnisse lassen sich aber aufgrund der strukturellen Unterschiede zwischen GnRH-Agonisten und GnRH-Antagonisten nicht trivial übertragen.

1.1.3 Das Growth-Hormone-Releasing Hormone und seine Analoga

Das Growth Hormone-Releasing Hormone (GHRH), auch als Somatoliberin bezeichnet, wurde erstmals 1982 von zwei verschiedenen Gruppen unabhängig voneinander aus humanen Pankreastumoren isoliert und charakterisiert [Guillemin et al., 1982; Rivier et al., 1982]. Die Gruppe um Roger Guillemin, welcher für seine Arbeiten zur Produktion von Peptidhormonen im Gehirn 1977 den Nobelpreis für Medizin erhalten hatte, isolierte dabei gleich drei Peptide, von denen das längste 44 Aminosäuren umfasste und die beiden anderen dessen N-terminale Sequenzabschnitte 1-37 sowie 1-40 umfassten. Später konnte gezeigt werden, dass alle drei Spezies in gleicher Weise biologisch aktiv und für den Erhalt der Wirkung lediglich die ersten 29 Aminosäuren der Sequenz von Bedeutung sind [Ling et al., 1984] (vgl. Abb. 3), weshalb die meisten Analoga auf Basis dieses Sequenzabschnittes entwickelt wurden. Das dazugehörige Gen wurde durch MAYO ET AL., 1985 identifiziert. Es umfasst 10 kb, enthält 5 Exons und ist auf Chromosom 20 lokalisiert.

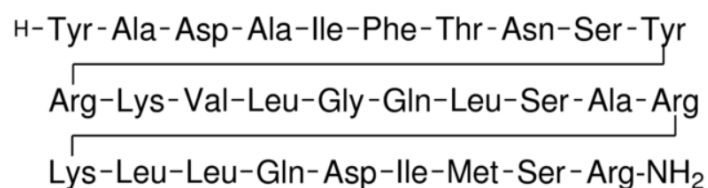


Abb. 3: Aminosäuresequenz des für die Wirkung relevanten, 29 Aminosäurereste umfassenden N-terminalen GHRH-Fragmentes (C-terminal amidiert)

GHRH wird vorrangig im Hypothalamus produziert [Bloch et al., 1984] und bindet an spezifischen Rezeptoren der Hypophyse, welche zur Sekretin-Rezeptor-Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören und 7 Transmembrandomänen aufweisen [Gaylinn et al., 1993; Gaylinn, 1999]. Durch die Rezeptorbindung wird eine Signalübertragungskaskade initiiert, welche Synthese und Freisetzung von GH (*Growth Hormone*), das auch als Somatotropin bezeichnet wird, stimuliert [Brazeau et al., 1982]. GH beeinflusst wiederum die Freisetzung von IGF-I (*Insulin-like Growth Factor-I*) aus der Leber und peripheren Geweben [Roberts et al., 1986; Leung et al., 1996]. Als physiologischer Antagonist von GHRH fungiert diesbezüglich Somatostatin [Harwood et al., 1984]. Die Sekretion von GHRH erfolgt pulsatil [Plotsky & Vale, 1985] und die Plasmahalbwertszeit beträgt infolge einer raschen enzymatischen Abspaltung der ersten beiden N-terminalen Aminosäuren, an deren Existenz die biologische Wirkung gekoppelt ist, lediglich 6,8 min [Frohman et al., 1986].

Anfängliche Bestrebungen zur pharmazeutischen Nutzung waren vorwiegend auf die Behandlung von Wachstumsstörungen gerichtet. So beschrieben THORNER ET AL., 1988 eine wachstumsfördernde Therapie bei Kindern mit GH-Mangel mit nativem GHRH, wobei aufgrund der kurzen Plasmahalbwertszeit eine subkutane Applikation des Wirkstoffes über 6 Monate hinweg alle 3 h erfolgen musste.

Die Hauptzielrichtung änderte sich jedoch, als deutlich wurde, dass synthetische Antagonisten des GHRH das Wachstum, die Proliferation sowie Invasivität und Metastasierung einer Vielzahl an Tumoren verringern können [Bellyei et al., 2010; Siejka et al., 2012]. Zunächst wurde die Ursache für diese Wirkung allein in der Reduktion von IGF-I und IGF-II infolge der GH-Suppression gesucht [Kovács et al., 1997]. Es ergaben sich jedoch bald Beispiele, bei denen zwar IGF-II eine Rolle spielte, die Wirkung jedoch nicht mit GH und damit auch nicht mit der systemischen Wirkung von GHRH in Verbindung stehen konnte, sondern vielmehr eine direkte Beeinflussung des Tumorgewebes durch GHRH-Antagonisten vorliegen musste [Szepeshazi et al., 2000]. Bahnbrechend war daher die Erkenntnis, dass verschiedene Tumore Splice-Varianten des GHRH-Rezeptors produzieren, von denen die Rezeptorvariante SV₁, welche eine umfangreiche Deletion im Bereich des extrazellulär lokalisierten N-Terminus und damit verbunden eine veränderte Bindungsspezifität aufweist, mit der Antitumorwirkung von GHRH-Antagonisten in Verbindung gebracht wird [Busto et al., 2002]. Inzwischen konnten diese Rezeptoren in den Membranen zahlreicher humaner Tumorzelllinien nachgewiesen werden [Schulz et al., 2006].

Die Entwicklung potenter GHRH-Antagonisten hat bereits mehrere Peptid-Generationen hervorgebracht. ROBBERECHT ET AL., 1985 erkannten, dass der Austausch von Ala² gegen D-Arg² ausreicht, um die antagonistische Wirkung zu erzielen. Das Einbringen einer hydrophoben Gruppierung am N-Terminus in Form einer Phenylacetyl-Gruppierung konnte die Affinität zum Rezeptor erheblich steigern, wobei noch hydrophobere Gruppierungen, wie etwa Naphthylacetyl, wiederum zu einer Verringerung der Wirksamkeit des Antagonisten *in vivo* führten und daher nicht weiter verfolgt wurden [Zarándi et al., 1994]. In weiteren Peptid-Generationen wurde die Affinität beispielsweise durch den Einbau positiv geladener Reste (meist Arginin oder Homoarginin) weiter gesteigert, wobei sich zeigte, dass die Antitumoraktivität separat von der systemischen Wirkung optimiert werden kann, sodass grundsätzlich auch die Entwicklung von Verbindungen im Raum steht, die spezifisch nur auf Tumorzellen wirken und keinen systemischen Eingriff in die Hormonkaskade mit sich bringen [Siejka et al., 2012]. Durch Einfügung von langkettigen Mono- und Dicarbonsäureresten im Bereich des N-Terminus konnten GHRH-Antagonisten generiert werden, die in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren [Jaeger et al., 2005].

Mehrere Untersuchungen belegen, dass GHRH-Antagonisten bei der Therapie sowohl benigner als auch maligner Prostatatumore unter Androgenmangel eine zusätzliche Hemmung des Tumorwachstums hervorrufen, weshalb synergistische Effekte eine Kombinationstherapie mit GnRH-Analoga und GHRH-Antagonisten besonders attraktiv erscheinen lassen [Letsch et al., 2004; Rick et al., 2012].

Neben den Antagonisten wurden eine Reihe hoch potenter GHRH-Agonisten entwickelt, deren pharmazeutische Relevanz im Bereich kardiovaskulärer Erkrankungen, von Diabetes und Wundheilungsprozessen angesiedelt ist [Cai et al., 2014].

1.2 Peptidaggregation und Aggregationsinhibitoren

1.2.1 Amyloides Verhalten

Der Amyloid-Begriff geht im Zusammenhang mit pathologisch relevanten Peptidablagerungen auf VIRCHOW, 1854 zurück, der bemerkte, dass betroffene Gewebeproben mit Iod eine ähnliche Farbreaktion wie Cellulose oder Stärke hervorrufen. Erst FRIEDREICH & KEKULÉ, 1859 konnten nachweisen, dass es sich dabei um protein-basierte Strukturen handelt. Die wegweisenden Erkenntnisse über den fibrillären Charakter dieser Aggregate [Cohen & Calkins, 1959] und deren Stabilisierung durch die Ausbildung hoher β -Faltblattanteile, die

senkrecht zur Fibrillenachse angeordnet sind [Bonar et al., 1969], gelangen jedoch erst nach der Entwicklung der Elektronenmikroskopie und der modernen Röntgenstrukturanalyse.

Die amyloide Aggregation bestimmter Peptide wird inzwischen für eine Vielzahl von Erkrankungen beschrieben, wobei neurodegenerative Veränderungen eine herausgehobene Stellung einnehmen [Sipe, 2005]. Bedeutende Beispiele sind diesbezüglich die amyloiden Aggregationen von A β und Tau im Fall von *Morbus Alzheimer* [Roychaudhuri et al., 2009; Bulic et al., 2009], von α -Synuclein bei *Morbus Parkinson* [Uversky, 2007], von Huntingtin bei *Chorea Huntington* [Ross & Tabrizi, 2011] oder von Prionen bei *spongiformen Enzephalopathien* [Aguzzi & Calella, 2009].

Das weitverbreitete Auftreten des amyloiden Aggregationstypes bei so verschiedenartigen Peptiden hat dazu geführt, dass heutzutage der Amyloid-Zustand als thermodynamisches Minimum für nahezu jedes Peptid angesehen wird, welcher jedoch aufgrund existierender Energiebarrieren nicht ohne weiteres aus der nativen Struktur eines Peptides erreichbar ist [Jahn & Radford, 2005]. Die native Konformation eines Peptides oder Proteins wird sowohl durch thermodynamische als auch durch kinetische Aspekte beeinflusst [Baker & Agard, 1994], wobei *in vivo* infolge der Effekte durch Kompartimentierungen und Chaperone noch weitere Einflussgrößen existieren. Die Ausbildung α -helikaler Strukturen kann dabei grundlegend als kinetisch, die Bildung von β -Faltblatt-Strukturen hingegen als thermodynamisch begünstigt angesehen werden. Für die Ausbildung amyloider Fibrillen muss die native Struktur erst soweit entfaltet werden, dass die Ausbildung intermolekularer β -Faltblatt-Strukturen ermöglicht wird. Umso stärker daher die native Konformation stabilisiert wird, desto höher wird auch die Energiebarriere, welche für die Initiierung der Amyloidbildung überwunden werden muss [Sipe, 2005]. So bildet α -Synuclein beispielsweise im gesunden Zustand unter physiologischen Bedingungen Tetramere, die von helikalen Strukturen dominiert werden und kein Aggregationspotential besitzen [Bartels et al., 2011]. Für den Ausbruch der Amyloidose wird dementsprechend angenommen, dass zunächst durch Fehlfaltungen vom nativen Zustand abweichende Peptidkonformationen gebildet werden, die zur Formierung initialer, oligomerer Keime für die Fibrillenbildung führen [Lee et al., 2011]. Dieser Keimbildungsprozess wird als limitierender Schritt der Aggregation angesehen, wohingegen das anschließende Fibrillenwachstum spontan verläuft [Harper & Lansbury, 1997]. Durch Fragmentierung der Fibrillen entstehen zudem ständig neue Keime, wodurch sich dieser Prozess selbst erhält und beschleunigt [Knowles et al., 2009].

Für die als "Prionen" bezeichneten amyloidbildenden Peptide ist darüber hinaus überzeugend belegt, dass eine Übertragung des Peptides in der pathogenen Konformation auf andere

Individuen, bei denen die Amyloidbildung und die damit einhergehende Krankheit auslösen kann und somit infektiös wirkt [Gajdusek, 1994]. Die pathogene Konformation weist dabei häufig einen erhöhten β -Faltblattgehalt auf. So besitzt die pathogene Konformation PrP^{Sc} des mit der Krankheit *Scrapie* verbundenen Prions einen sehr hohen β -Faltblattanteil von 43 %, während die korrespondierende native Konformation PrP^{C} nur zu etwa 3 % aus β -Faltblättern besteht und dafür einen hohen α -Helix-Anteil besitzt [Pan et al., 1993]. Bei diesem Übertragungsvorgang induziert der eingebrachte Keim eine Umfaltung der gesunden, nativen Konformation in die pathogene Variante. Dieser Prozess scheint eine hohe Sequenzhomologie zwischen dem eingebrachten Peptid und dem zur Amyloidbildung rekrutierten Peptid vorauszusetzen, sodass einerseits zwar eine Übertragung einer Amyloidose durchaus über Speziesgrenzen hinweg erfolgen kann, wobei die Übertragung von BSE (*Bovine Spongiform Encephalopathy*) von Rindern auf Menschen den bekanntesten Fall darstellt [Moore et al., 2005], andererseits jedoch bisher kein Fall bekannt ist, bei dem die Aggregation eines völlig anderen, amyloidbildenden Peptides durch Prionübertragung ausgelöst wurde [Sipe, 2005]. Dieses Risiko wird aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit amyloider Aggregate aber immer wieder diskutiert. Diesbezüglich konnten MAJI ET AL., 2008 *in vitro* demonstrieren, dass die Gegenwart amyloider Aggregate diverser GnRH-Analoga zumindest keine Aggregation des nativen GnRH oder von α -Synuclein induziert.

Es ist umstritten, ob die gebildeten fibrillären Ablagerungen selbst für die pathologischen Effekte verantwortlich sind [Wolfe & Cyr, 2011]. Stattdessen gibt es inzwischen auch Hinweise auf neuroprotektive Wirkungen durch amyloide Ablagerungen [Treusch et al., 2009]. Für die mit Amyloidosen einhergehende cytotoxische Wirkung werden demgegenüber verstärkt oligomere Zwischenstufen verantwortlich gemacht [Resende et al., 2008].

1.2.2 Inhibitoren der amyloiden Peptidaggregation

Physiologisch auftretende amyloidbildende Peptide entstehen in der Regel erst durch die spezifische Spaltung eines nicht-aggregierenden Vorläuferproteins [Sipe, 2005]. Im Falle der mit *Morbus Alzheimer* assoziierten A β -Peptide werden diese beispielsweise erst infolge einer Spaltung von APP (*Amyloid-Precursor Protein*) durch β - und γ -Sekretase gebildet, was eben jene Enzyme zu einem attraktiven Ziel für die Reduktion der gebildeten A β -Menge und eine dadurch bewirkte Verringerung der Amyloidbildung macht [Vassar & Citron, 2000; Tomita, 2008]. Es wurde dagegen jedoch der grundlegende Einwand vorgebracht, dass die genannten Enzyme und auch das monomere A β selbst eine physiologische Bedeutung haben, wodurch

diese Strategie nicht spezifisch auf den pathologischen Zustand zielt und das Risiko erheblicher Nebenwirkungen mit sich bringt [Giuffrida et al., 2009; Nie et al., 2011].

Einen in dieser Beziehung spezifischen Ansatz stellt hingegen der Versuch dar, den Aggregationsprozess selbst zu hemmen, was auf unterschiedlichen Ebenen geschehen kann [Härd & Lendel, 2012].

Auf der Ebene des Monomers ist es möglich, die Bildung intermolekularer β -Faltblatt-Strukturen durch synthetische Einführung einer großen Anzahl an N-Methylierungen an den Peptidbindungen zu unterbinden, wobei häufig eine Methylierung jeder zweiten Peptidbindung als wirkungsvoll beschrieben wird [Kokkoni et al., 2006].

Ein weiterer Ansatz auf Monomerebene besteht darin, die amyloid-bildenden Monomere durch Interaktion mit einem anderen Protein voneinander abzuschirmen. Um für diesen Zweck ein entsprechend affines Protein zu finden, wendeten GRÖNWALL ET AL., 2007 die *Affibody*-Strategie erfolgreich an, um aus einer breiten Bibliothek an Proteinen einen Vertreter zu identifizieren, der A β zu binden vermag. Sie konnten dabei zeigen, dass A β durch das gefundene Protein ZA β 3 in einer Haarnadel-Struktur fixiert wird und dadurch die Amyloidbildung unterbunden werden kann [Hoyer et al., 2008].

Große Anstrengungen werden allerdings vorzugsweise dahingehend unternommen, niedermolekulare Verbindungen zu finden, welche die Amyloidbildung aufhalten können. Die dabei erhaltenen Substanzen stammen häufig aus umfangreichen *Screening*-Programmen, sodass zwar ihr inhibitorischer Effekt, aber nicht unbedingt ihre Wirkungsebene bekannt sind. Es wird jedoch vermutet, dass ihr Effekt häufig auf der Stabilisierung kleiner Oligomere beruht, die nicht auf dem kinetischen Pfad zur Amyloidbildung liegen [Härd & Lendel, 2012].

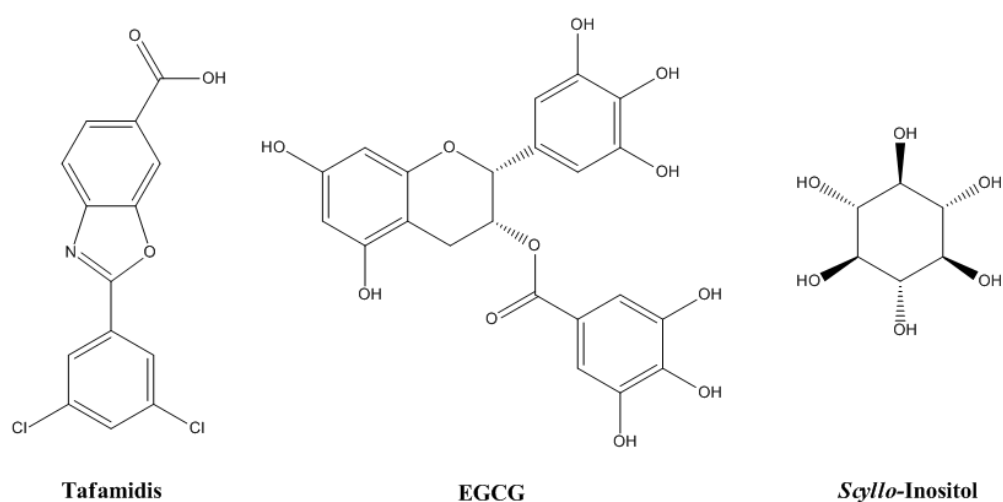


Abb. 4: Strukturformeln der niedermolekularen Amyloid-Inhibitoren Tafamidis, Epigallocatechin-gallat (EGCG) und *Scyllo*-Inositol

Gut verstanden ist diesbezüglich die Wirkung von Tafamidis (2-(3,5-Dichlorphenyl)-1,3-Benzoxazol-6-carbonsäure) (vgl. Abb. 4), welches in den letzten Jahren in verschiedenen Staaten für die Behandlung der Transthyretin-assoziierten familiären Amyloid-Polyneuropathie (TTR-FAP) zugelassen wurde. Wie in Abb. 5 zu sehen, stabilisiert es die native, tetramere Struktur des Proteins Transthyretin [Nilsson et al., 1975; Bulawa et al., 2012]. Da die Energiebarriere für die Dissoziation des Tetramers in die korrespondierende monomere Form, welche für die Amyloidbildung des Proteins erforderlich ist [Lai et al., 1996], auf diese Weise erhöht wird, wirkt Tafamidis als kinetischer Inhibitor der Amyloidbildung [Johnson et al., 2005].

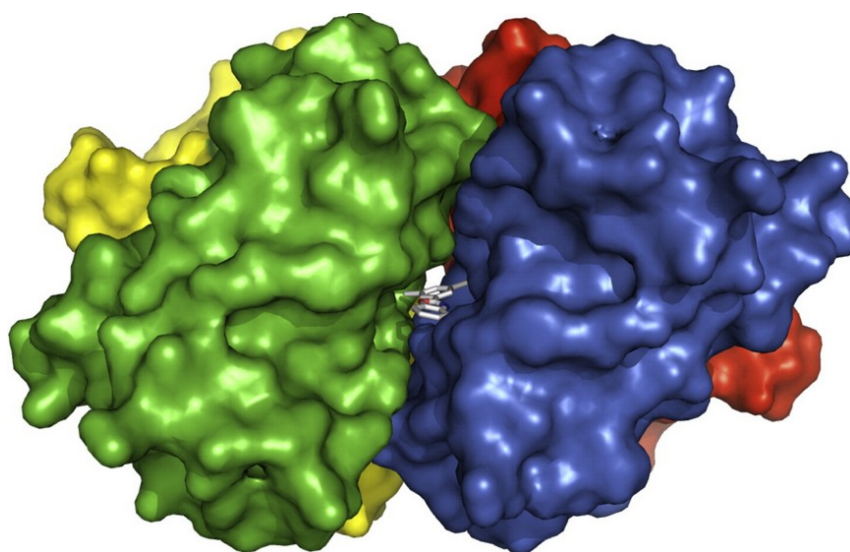


Abb. 5: Röntgenkristallstruktur des tetrameren Transthyretin im Komplex mit Tafamidis (PDB ID: 2QGE) [nach: Hård & Lendel, 2012]

Vielversprechende Ergebnisse zeigen auch diverse polyphenolische Verbindungen, wobei Epigallocatechingallat (EGCG) (vgl. Abb. 4) besonders intensiv untersucht wird, da es sowohl gegenüber Huntingtin [Ehrnhöfer et al., 2006], als auch bei A β und α -Synuclein [Bieschke et al., 2010] als effektiver Inhibitor der Amyloidbildung und der damit einhergehenden Zytotoxizität fungiert. Die Anordnung der phenolischen OH-Gruppen scheint bei flavonoid-basierten Verbindungen in enger Verbindung zu ihrer inhibitorischen Wirkung zu stehen [Meng et al., 2010].

Auch zuckerähnliche Verbindungen wie Inositol (vgl. Abb. 4) wurden als Inhibitoren der Amyloidbildung beschrieben, wobei in diesem Fall die Anordnung der OH-Gruppen gleichfalls die Wirkung maßgeblich beeinflusst [McLaurin et al., 2000].

1.3 Peptidstrukturanalytik

1.3.1 Untersuchung der Sekundärstruktur von Peptiden mittels Infrarot-Spektroskopie

Moleküle absorbieren Strahlung im mittleren Infrarotbereich ($4000 - 200 \text{ cm}^{-1}$) unter Anregung derjenigen Schwingungsmoden, welche mit einer Änderung des Gesamtdipolmomentes einhergehen, wodurch die FTIR-Spektroskopie im genannten Wellenzahlbereich insbesondere wertvolle Beiträge zur Strukturanalytik polarer Gruppierungen liefern kann [Skoog & Leary, 1996]. Praktisch findet häufig das Prinzip der ATR-FTIR-Spektroskopie (*attenuated total-reflectance Fourier-Transform infrared*) Anwendung, bei welchem die IR-Strahlung durch einen Kristall hoher optischer Dichte (z.B. Diamant oder Zinkselenid) unter Totalreflexions-Bedingungen auf den Analyten geleitet wird, wobei eine Wechselwirkung des Analyten mit der einfallenden Strahlung im evaneszenten Feld erfolgt, was wiederum eine Ermittlung des Absorptionsspektrums aus dem reflektierten Strahl erlaubt [Harrick, 1960; Fahrenfort, 1961; Kortüm, 1969]. Im Unterschied zur klassischen Transmissions-IR-Spektroskopie besteht bei dieser Reflexionstechnik jedoch eine systematische Abhängigkeit der Eindringtiefe und damit verbunden auch des Wechselwirkungsvolumens zwischen Strahlung und Analyt von der Wellenzahl, weshalb für die Generierung von Spektren, die mit in Transmissionsanordnung aufgenommenen Spektren vergleichbar sind, eine von HARRICK, 1963 hergeleitete, mathematische Korrektur notwendig wird.

Aufgrund des polaren Charakters der Peptidbindungen dominieren deren Schwingungsmoden die auftretende Bandenstruktur im Infrarotspektrum von Peptiden und Proteinen und bieten damit die Grundlage für eine IR-spektroskopische Untersuchung der vorliegenden Sekundärstruktur. Von besonderer Relevanz sind dabei die Amid A-Bande, welche von der N-H-Valenzschwingung der Peptidbindungen dominiert wird und bei ca. 3300 cm^{-1} auftritt, die Amid I-Bande, welche zu großen Anteilen der C=O-Valenzschwingung entspricht und bei Wellenzahlen zwischen 1700 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} beobachtet wird, und die Amid II-Bande, welche Anteile von N-H-Deformations- und N-C-Valenzschwingungen enthält und ihrerseits bei ca. 1550 cm^{-1} erscheint [Galla & Müller, 1988; Kong & Yu, 2007].

Schon frühzeitig wurde versucht, Zusammenhänge zwischen der Form der Amid-Banden und der Sekundärstruktur herzustellen. So erkannte KRISTOF, 1979, dass die Amid A-Bande in α -helikalen und β -Faltblatt-Strukturen nur ein Drittel der Halbwertsbreite einer ungeordneten Zufallsknäuelstruktur erreicht.

Einen herausgehobenen Stellenwert besaß aber stets die Analyse der Bandenform der Amid I- und Amid II-Banden. MIYAZAWA & BLOUT, 1961 konnten auf Basis quantenchemischer Rechnungen einen Zusammenhang zwischen der Position des Maximums dieser Banden und der Sekundärstruktur teilweise theoretisch begründen, wobei sie die auftretenden Schwingungsmoden mit den unterschiedlichen Wasserstoffbrückenbindungen in den einzelnen Sekundärstrukturarten in Verbindung brachten. Diese Korrelation ist heute allgemein anerkannt und wird in der Regel damit begründet, dass in Abhängigkeit von der Stärke der ausgebildeten Wasserstoffbrücken die $[\text{O}=\text{C}=\text{NH}^+]$ -Resonanzstruktur der Peptidbindung zunehmend gegenüber der $[\text{O}=\text{C}-\text{NH}]$ -Resonanzstruktur begünstigt wird, was die differierenden Bandenmaxima der korrespondierenden Amid-Banden aufgrund der veränderten Bindungsordnungen erklärt [Milner-White, 1997]. Mithilfe von DFT-Rechnungen konnte zudem gezeigt werden, dass die Veränderung der Amid I-Bande vorwiegend von Wasserstoffbrücken an der zugehörigen C=O-Gruppe abhängt, wohingegen die Amid II-Bande fast ausschließlich durch Wasserstoffbrückenbindungen unter Beteiligung der zugehörigen N-H-Gruppierung beeinflusst wird [Myshakina et al., 2008].

Das Maximum der Amid I-Bande zeigt eine enge Korrelation zur vorliegenden Sekundärstruktur. So tritt für α -helikale Strukturen ein Maximum zwischen 1660 cm^{-1} und 1650 cm^{-1} auf, während β -Faltblattstrukturen zwischen 1640 cm^{-1} und 1624 cm^{-1} beobachtbar sind und Zufallsknäuelanordnungen zu Maxima bei ca. 1650 cm^{-1} führen [Miyazawa & Blout, 1961; Dong et al., 1990]. Die konkrete Bandenform und -lage der Amid I-Bande wird jedoch ebenfalls von der konkreten chemischen Umgebung der jeweiligen Peptidbindungen beeinflusst, sodass gewisse Schwankungen zwischen verschiedenen Proteinen auftreten und beispielsweise auch in einem einzigen Protein nebeneinander mehrere voneinander unterscheidbare β -Faltblatt-Banden detektiert werden können [Kong & Yu, 2007].

Um die relativen Anteile bestimmter Sekundärstrukturelemente aus einer experimentell ermittelten Amid I-Bande eines realen Peptides oder Proteins bestimmen zu können, wurden vielfältige Verfahren unter Ausnutzung von PLS-Methoden (*partial least-squares*) [Lee et al., 1990], mithilfe Datenbanken-gestützter Methoden [Sarver & Krueger, 1991], durch Bandenzerlegung in Gauss-Funktionen [Surewicz et al., 1993] oder auch basierend auf der Auswertung der zweiten Ableitung des Infrarotspektrums [Susi & Byler, 1986; Dong et al., 1990] entwickelt. Alle diese Methoden basieren jedoch in bestimmten Aspekten darauf, zunächst empirische Zusammenhänge zwischen den IR-Spektren von Standardproteinen mit deren, meist aus Röntgenstrukturanalysen bekannten Sekundärstrukturanteilen herzustellen, um auf dieser Basis anschließend die Sekundärstrukturanteile eines unbekannten Proteins aus

dessen IR-Spektrum abzuleiten. Für Cetrorelix-Aggregate konnte diesbezüglich in der Arbeitsgruppe um Dr. Naumann mithilfe eines Datenbanken-gestützten Ansatz bereits die Existenz eines hohen β -Faltblattanteiles gezeigt werden [Rattei, 2002].

1.3.2 Untersuchung der Struktur von Peptidaggregaten mithilfe struktur-sensitiver Sonden

Es gibt eine Reihe an Substanzen, die an spezifische Strukturen von Peptidaggregaten unter Veränderung ihrer optischen Eigenschaften binden können und sich daher als Sonden für die Charakterisierung solcher Aggregate eignen [Hawe et al., 2008].

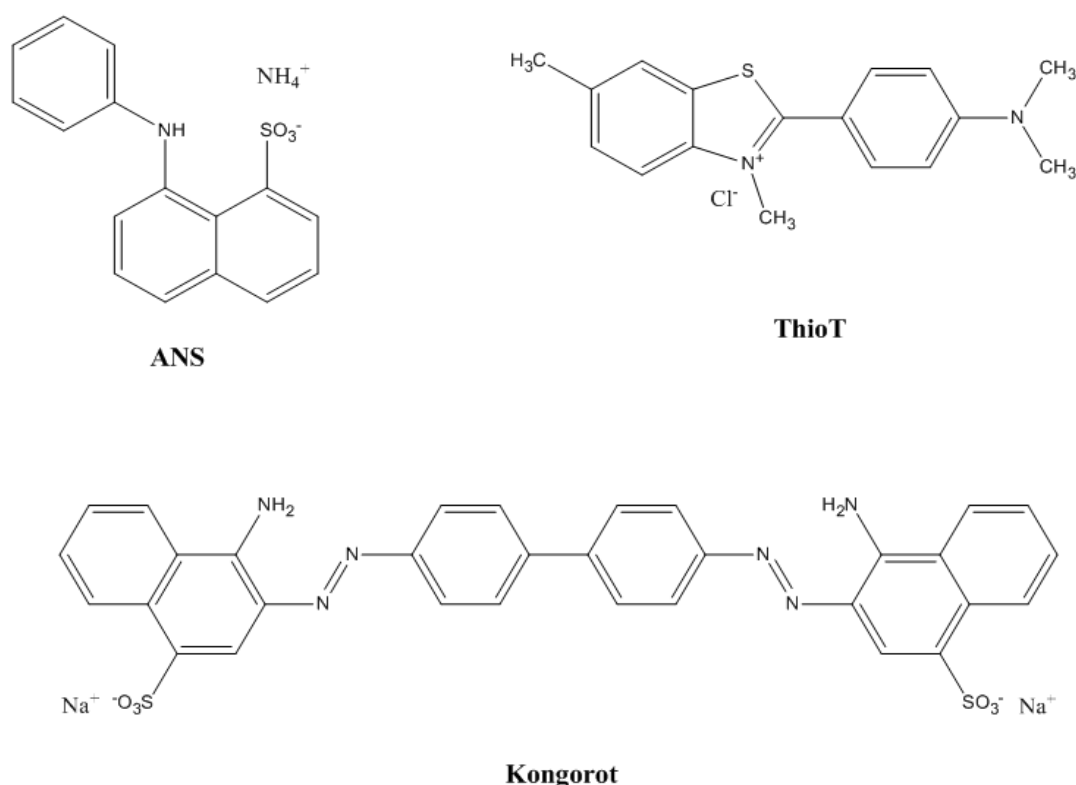


Abb. 6: Strukturformeln der Hydrophobie-Sonde Ammonium-1,8-anilino-naphthalinsulfonat (ANS), sowie der Amyloid-Sonden Thioflavin T (ThioT) und Kongorot

Die Fluoreszenzsonde Ammonium-1,8-anilino-naphthalinsulfonat (ANS) (vgl. Abb. 6) ist hervorragend geeignet, um hydrophobe Bereiche in Proteinstrukturen zu untersuchen [Stryer, 1965]. In polarer Umgebung ist der strahlungsfreie Übergang vom angeregten Zustand des Moleküls zum Grundzustand via TICT (*twisted intramolecular charge transfer*) bevorzugt, bei welchem sich im Zuge eines Elektronentransfers die Anilin-Gruppierung gegen das Naphthalinsystem verdreht [Das et al., 1992]. Mit abnehmender Polarität und steigender

Viskosität der Umgebung der Sonde wird jedoch zunehmend der Prozess der Fluoreszenz-emission präferiert, um in den Grundzustand zurückzukehren, was sich in einer Zunahme der Quantenausbeute und einer Blauverschiebung äußert [Slavik, 1982].

Für die spezifische Untersuchung der amyloid-typischen, β -Faltblatt-reichen Aggregate sind die beiden Sonden Kongorot (CR) und Thioflavin T (ThioT) (vgl. Abb. 6) weit verbreitet [Reinke & Gestwicki, 2011]. Bereits BENNHOLD, 1922 beschrieb die spezifische Färbung amyloider Ablagerungen durch Kongorot und DIVRY & FLORKIN, 1927 erkannten, dass die so gefärbten Ablagerungen eine verstärkte Doppelbrechung aufweisen, was noch heute für den qualitativen Nachweis der Amyloidität verwendet wird [Sipe, 2005]. Bei der Bindung an amyloide Strukturen zeigt das UV/vis-Spektrum von Kongorot eine spezifische Veränderung. Während die ungebundene Sonde ein Absorptionsmaximum bei ca. 498 nm aufweist, zeigt die amyloid-gebundene Spezies ein strukturiertes Absorptionsspektrum bei deutlich höheren Wellenlängen, wobei der Unterschied beider Spektren bei 540 nm am größten ist. Dieses spektrale Verhalten kann für die Quantifizierung des Amyloidgehaltes herangezogen werden [Klunk et al., 1989].

Die Fähigkeit von Thioflavin T, Amyloide spezifisch zu färben, wurde erstmals von VASSAR & CULLING, 1959 erkannt. In diesem Fall verläuft die bevorzugte Relaxation aus dem angeregten Zustand für das freie Sondenmolekül strahlungsfrei über eine sehr schnelle Drehung um die Bindung zwischen Anilin- und Benzothiazol-Gruppierung [Singh et al., 2010]. Im amyloid-gebundenen Zustand wird diese Drehung gehindert, sodass stattdessen Fluoreszenzemission beobachtbar wird. Für die Nutzung dieser Sonde zum Erhalt quantitativer Aussagen bezüglich des Amyloid-Gehaltes einer Probe muss berücksichtigt werden, dass ThioT eine cmc (*critical micellar concentration*) von 4 μ M aufweist und bei höheren Konzentrationen durch Assoziationsprozesse falsche Werte geben kann [Khurana et al., 2005].

Sowohl Kongorot als auch Thioflavin T binden bevorzugt parallel zur Achse der Amyloidfibrillen und damit senkrecht zur β -Faltblatt-Ausrichtung [Wu et al., 2007; Wu et al., 2008]. In dieser Anordnung überspannen die beiden Sonden mehrere nebeneinander in β -Faltblatt-Struktur angeordnete Peptidketten und liegen zwischen den senkrecht herausragenden Seitenketten wie in einem Tal eingebettet [Reinke & Gestwicki, 2011]. Kongorot überspannt dabei mehr als 5 nebeneinander liegende Peptidketten und bindet aufgrund der negativ geladenen Sulfonat-Gruppen bevorzugt, jedoch keineswegs ausschließlich in der Nähe positiv geladener Aminosäurereste [Wu et al., 2007]. Thioflavin T ist etwas kürzer und bindet eher in Gegenwart hydrophober Reste [Wu et al., 2008].

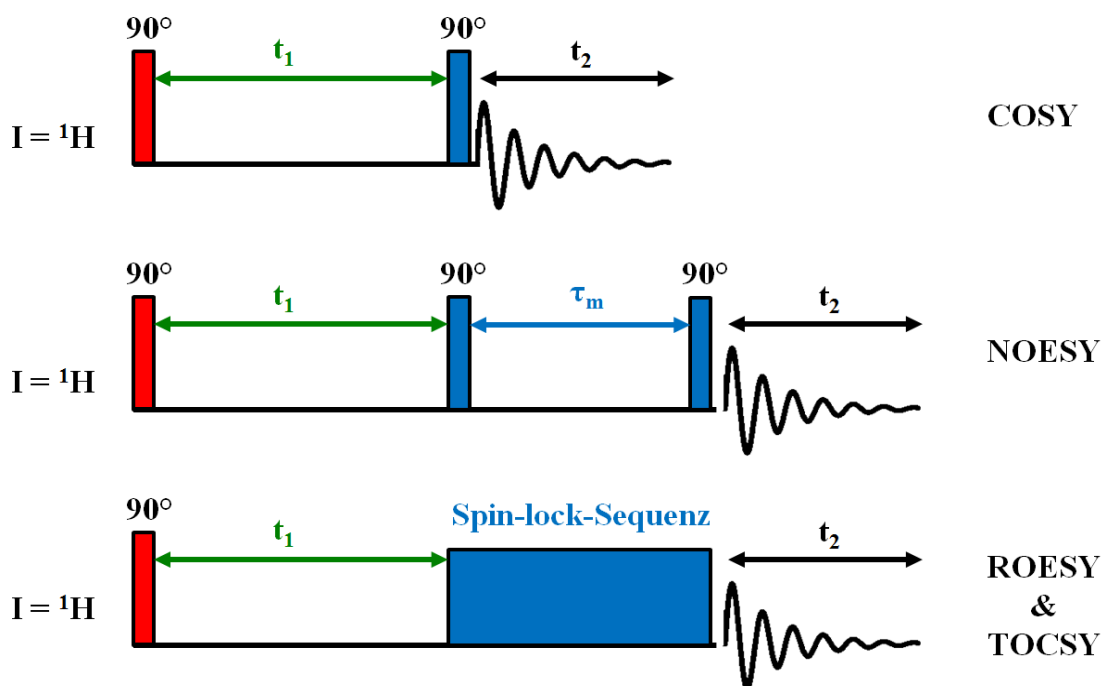
1.3.3 Untersuchung von Peptidstrukturen mithilfe zweidimensionaler NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie stellt im Bereich der modernen Chemie eines der, wenn nicht gar das bedeutendste Instrumentarium zur Strukturanalytik auf molekularer Ebene dar. Erste NMR-Untersuchungen an Biopolymeren wurden bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt von SAUNDERS ET AL., 1957 am Beispiel der Ribonuklease veröffentlicht. Der wegbereitende methodische Durchbruch gelang jedoch erst durch die Einführung der zweidimensionalen NMR-Spektroskopie, deren Grundprinzip erstmals von JEENER, 1971 formuliert und in der Folge insbesondere an der ETH Zürich in der Gruppe um Richard R. Ernst methodisch erforscht und weiterentwickelt wurde [Aue et al., 1976; Ernst et al., 1987]. Für seine Leistungen auf diesem Gebiet erhielt R. R. Ernst 1991 den Nobelpreis für Chemie.

Zweidimensionale NMR-Experimente werden stets an FT-Geräten realisiert und lassen sich grundsätzlich in die vier Phasen Präparation, Evolution, Mischung und Detektion unterteilen. Während der initialen Präparation wird durch eine bestimmte Folge an RF-Pulsen das Spinsystem vorbereitet, bevor es sich während der Evolutionsphase t_1 unter dem Einfluss des statischen Magnetfeldes in Abhängigkeit von der chemischen Verschiebung und der skalaren Kopplung des jeweiligen Kernes entwickeln kann. Die daran anschließende Mischungsphase generiert durch eine erneute Folge von RF-Pulsen einen Kohärenztransfer, der auf spezifischen Kopplungen zwischen den interagierenden Kernen beruht. In der abschließenden Detektionsphase wird der resultierende FID (*free induction decay*) in der zweiten Zeitdomäne t_2 aufgenommen. Zum Erhalt des zweidimensionalen Datensatzes wird die Evolutionszeit t_1 inkrementiert und der beschriebene Ablauf in Abhängigkeit von t_1 mehrfach wiederholt. Das finale 2D-Spektrum wird durch Fourier-Transformation bezüglich beider Zeitdomänen erhalten [Friebolin, 2013].

Das $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY (*Corellation Spectroscopy*) stellt das einfachste homonukleare 2D-NMR-Experiment dar [Aue et al., 1976]. Die grundlegende Pulsabfolge ist, wie auch für die im Folgenden besprochenen homonuklearen Experimente, in Abb. 7 dargestellt. Sowohl die Präparations- als auch die Mischungsphase bestehen in diesem Fall jeweils aus einem einzelnen 90° -Puls. Der beobachtete Kohärenztransfer ist auf skalare Kopplungen über zwei ($^2J_{\text{HH}}$) oder drei Bindungen ($^3J_{\text{HH}}$) zwischen den interagierenden ^1H -Kernen zurückzuführen und erlaubt daher die Ermittlung kovalenter Nachbarschaftsbeziehungen. Die Intensität der Kreuzpeaks in einem $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY ist direkt von der Kopplungskonstante J abhängig, welche ihrerseits stark mit der Anzahl der zwischen den koppelnden Kernen liegenden Bindungen

abnimmt, sodass schon Kopplungen über vier Bindungen (${}^4J_{HH}$) kaum noch erkennbar sind. Von besonderer Bedeutung sind daher Kopplungen über drei Bindungen (${}^3J_{HH}$).



Präparation – Evolution – Mischung – Detektion

Abb. 7: Visualisierung der 4 Grundphasen zweidimensionaler NMR-Verfahren sowie der Pulssequenzen der homonuklearen COSY-, NOESY-, TOCSY- und ROESY-Experimente

Für eine solche, als vicinal bezeichnete Kopplung zeigt die Kopplungskonstante J eine ausgeprägte Abhängigkeit vom Diederwinkel zwischen den wechselwirkenden Kernen, was erstmals von KARPLUS, 1959 auf Basis der VB-Theorie am Beispiel des Ethans gezeigt wurde. Die Abhängigkeit der Kopplungskonstante ${}^3J_{HCCH}$ vom Diederwinkel ϕ konnte er näherungsweise mithilfe von Gl. 1 beschreiben.

$${}^3J_{HCCH}(\phi) = A \cdot \cos^2 \phi - K \quad (\text{Gl. 1})$$

mit $K = -0,28$

$$A = 8,5 \text{ für } 0^\circ \leq \phi \leq 90^\circ$$

$$A = 9,5 \text{ für } 90^\circ \leq \phi \leq 180^\circ$$

Wenig später formulierte Martin Karplus die entsprechende Beziehung mit einheitlichen Koeffizienten für alle Diederwinkel in Form von Gl. 2 [Karplus, 1963], für welche BOTHNER-BY, 1965 die empirischen Werte $A = 7$, $B = -1$ und $C = 5$ vorschlug. Für die

Berechnung von Diederwinkeln aus experimentell bestimmten Kopplungskonstanten wird häufig die als Gl. 3 aufgeführte, zu Gl. 2 trigonometrisch identische Form der Karplus-Gleichung verwendet [Coxon, 1972; Coxon, 2009].

$${}^3J_{HCCH}(\varphi) = A + B \cdot \cos \varphi + C \cdot \cos 2\varphi \quad (\text{Gl. 2})$$

$${}^3J_{HCCH}(\varphi) = A \cdot \cos^2 \varphi + B \cdot \cos \varphi + C \quad (\text{Gl. 3})$$

Die Übertragung dieser Erkenntnisse auf vicinale Kopplungen unter Beteiligung von Stickstoff (${}^3J_{HCNH}$) durch BOTHNER-BY & COX, 1969 legte schließlich die Grundlagen für eine direkte Anwendung dieser Beziehung zur Analyse von Peptidrückgratstrukturen.

Während mithilfe des COSY-Experimentes lediglich skalare Kopplungen in unmittelbarer Nachbarschaft erfasst werden können, ermöglicht das erstmals von BRAUNSCHWEILER & ERNST, 1983 vorgeschlagene TOCSY-Experiment (*Total Correlation Spectroscopy*) die Detektion kompletter, miteinander koppelnder Spinnetzwerke. Im Unterschied zu der bereits besprochenen Pulsabfolge für das COSY-Experiment wird für das TOCSY-Experiment während der Mischungsphase eine Spin-lock-Sequenz eingesetzt, welche im einfachsten Fall aus mehreren, in kurzen Intervallen aufeinander folgenden 180° -Pulsen besteht, wodurch die erzeugten Magnetisierungen quasi über den gesamten Zeitraum der Mischungsphase parallel zueinander im rotierenden Bezugssystem angeordnet bleiben (vgl. Abb. 7). Auf diese Weise wird der Einfluss der chemischen Verschiebung zeitweilig aufgehoben, wohingegen die skalaren Kopplungseffekte weiterhin wirken. Bei ausreichender Spin-lock-Zeit können somit mehrere COSY-artige Kopplungen nacheinander erfolgen, wodurch Kohärenztransfers zwischen allen Kernen des Spinsystems auftreten. Die dabei ablaufenden Vorgänge können prinzipiell als homonukleare Variante des Hartmann-Hahn-Experimentes betrachtet werden, weshalb auch die Bezeichnung HOHAHA (*Homonuclear Hartmann-Hahn Spectroscopy*) für dasselbe Experiment verwendet wird [Hartmann & Hahn, 1962; Bax et al., 1985; Bax & Davis, 1985 (1)]. Für die Anwendung dieser Methode auf Makromoleküle stellte die Entwicklung der MLEV-17-Pulsfolge als spezielle Spin-lock-Sequenz durch BAX & DAVIS, 1985 einen Meilenstein dar. Seit der ersten Anwendung des TOCSY-Experimentes auf Proteine durch CLORE ET AL., 1986 hat es sich als eines der wichtigsten Experimente für die Signalzuordnung von Peptiden und Proteinen etabliert.

Die skalare Kopplung lässt sich jedoch selbst mit einem TOCSY nicht über Peptidbindungen oder unprotonierte Kohlenstoffatome, wie beispielsweise in der jeweiligen γ -Position von

Histidyl- oder Phenylalanyl-Resten, hinaustreiben, sodass allein mit den bisher genannten Experimenten keine komplette, sequenzspezifische Signalzuordnung möglich ist. Die fehlenden Korrelationen können jedoch auf Basis des von ANET & BOURN, 1965 erkannten Kern-Overhauser-Effektes (NOE: *Nuclear Overhauser Effect*) ermittelt werden, welcher den auftretenden Kohärenztransfer zwischen zwei räumlich benachbarten Spins aufgrund dipolarer Kopplungen während eines Entkopplungs-Experimentes beschreibt. Der dabei auftretende Kohärenztransfer erfolgt direkt durch den Raum und zeigt eine r^{-6} -Abhängigkeit vom Abstand r zwischen den beiden miteinander in Wechselwirkung stehenden Kernen. Auf dieser Basis ist dementsprechend eine semiquantitative Bestimmung aller Protonenabstände einer NMR-Probe möglich, welche 5 Å nicht deutlich übersteigen [Noggle & Schirmer, 1971].

Das am häufigsten eingesetzte 2D-NMR-Verfahren zur Erfassung von NOE-Korrelationen ist das $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY-Experiment (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) [Jeener et al., 1979; Macura & Ernst, 1980]. Die in Abb. 7 dargestellte Pulsabfolge verdeutlicht, dass in diesem Fall die Mischungs-Phase aus zwei 90° -Pulsen besteht, die durch eine bestimmte *mixing time* τ_m voneinander getrennt erfolgen. Die Intensität der beobachteten Kreuzpeaks ist direkt vom korrespondierenden NOE und damit über die angesprochene r^{-6} -Beziehung vom Abstand der jeweils korrelierten Kerne abhängig, womit diese Technik die Grundlage für die meisten 3D-Strukturbestimmungen von Peptiden und Proteinen bildet. Besonderes Augenmerk muss hierfür jedoch auf die korrekte Wahl der *mixing time* τ_m gelegt werden. Je länger diese gewählt wird, um so größere Abstände können detektiert werden. Gleichzeitig steigt aber auch das Risiko, dass 3-Spin-Effekte (Spin-Diffusion) zu Artefakten im Spektrum führen, die für die Strukturberechnung nicht berücksichtigt werden dürfen [Bax, 1989]. Diese Problematik ist in der Peptid- und Proteinanalytik deshalb besonders relevant, weil die erwünschten 2-Spin-Signale für Analyten mit Molekülmassen oberhalb von 1000 Da im NOESY-Spektrum ebenso zu negativen Signalen führen, wie die möglicherweise auftretenden 3-Spin-Effekte.

Eine Möglichkeit Kreuzpeaks, welche auf 3-Spin-Effekten beruhen, sicher ausschließen zu können, bietet das $^1\text{H}/^1\text{H}$ -ROESY-Experiment (*Rotating-frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) [Bothner-By et al., 1984; Bax & Davis, 1985 (2)]. Durch die Anwendung einer Spin-lock-Sequenz während der Mischungs-Phase werden die erzeugten Magnetisierungen analog zum TOCSY-Experiment im rotierenden Bezugssystem parallel zueinander fixiert, während der Kohärenztransfer aufgrund dipolarer Kopplungen erfolgt. Ein Kohärenztransfer aufgrund eines direkten NOE's führt zu einem Vorzeichenwechsel im ROESY-Spektrum,

sodass Kreuzpeaks in entgegengesetzter Phase zu den Diagonalpeaks erscheinen. Bei Auftreten eines weiteren NOE's im Rahmen eines 3-Spin-Effektes erfolgt ein erneuter Vorzeichenwechsel, womit eine eindeutige Identifikation solcher Signale möglich ist [Bax et al., 1986].

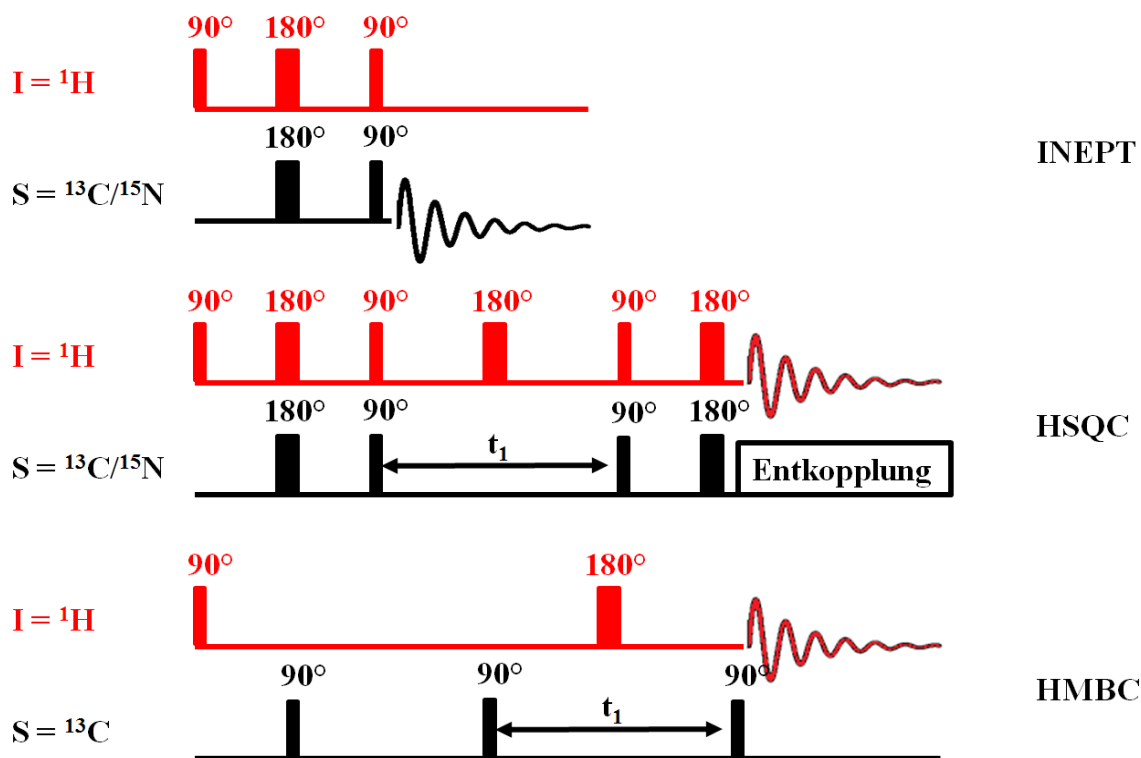


Abb. 8: Grundlegende Pulsfolgen der heteronuklearen INEPT-, HSQC- und HMBC-Experimente

Neben homonuklearen 2D-NMR-Experimenten sind für eine gesicherte Signalzuordnung für Peptide und Proteine auch heteronukleare Experimente unter Beteiligung von ${}^{13}\text{C}$ - und ${}^{15}\text{N}$ -Kernen erforderlich. Der große Nachteil liegt allerdings in der deutlich geringeren Sensitivität von NMR-Experimenten gegenüber diesen Kernen im Vergleich zu ${}^1\text{H}$ -Kernen aufgrund der geringen natürlichen Häufigkeit der genannten Isotope und des ungünstigeren gyromagnetischen Verhältnisses. Bahnbrechend war daher die Einführung des INEPT-Verfahrens (*In*sensitive *N*uclei *E*nhanced by *P*olarisation *T*ransfer) durch MORRIS & FREEMAN, 1979, durch welches ein Kohärenztransfer via skalarer Kopplung (1J) von einem empfindlichen Kern (${}^1\text{H}$) auf einen benachbarten unempfindlichen Kern (${}^{13}\text{C}$, ${}^{15}\text{N}$) realisiert wird. Auf dieser Basis entwickelten BODENHAUSEN & RUBEN, 1980 das ${}^1\text{H}/{}^{15}\text{N}$ -HSQC-Experiment (*H*eteronuclear *S*ingle *Q*uantum *C*oherence), bei welchem zunächst durch eine INEPT-Pulsabfolge ein Kohärenztransfer von ${}^1\text{H}$ auf ${}^{15}\text{N}$ erfolgt, bevor nach einer inkrementierten Evolutionszeit durch eine retro-INEPT-Pulsabfolge ein entgegengesetzter

Transfer erzielt wird. Auf diese Weise erhält man ein Spektrum, welches die chemische Verschiebung eines ^{15}N - bzw. analog auch eines ^{13}C -Kernes mit den chemischen Verschiebungen der direkt daran gebundenen ^1H -Kerne widerspiegelt.

Um heteronukleare Korrelationen über mehrere Bindungen hinweg beobachten zu können, entwickelten BAX & SUMMERS, 1986 auf Basis des von MÜLLER, 1979 veröffentlichten HMQC-Experimentes (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*) ein Verfahren namens HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*). Bei diesem Verfahren werden durch einen $90^\circ(^{13}\text{C})$ -Puls die Korrelationen über eine einzige Bindung ($^1J_{\text{CH}}$), welche bei HSQC und HMQC bewusst detektiert werden, unterdrückt und im Anschluss durch eine Folge mehrerer 90° - und 180° -Pulse ^1H - ^{13}C -Multiquanten-Kohärenzen generiert, welche einerseits durch homonukleare Protonenkopplungen und andererseits durch die chemischen Verschiebungen der ^{13}C -Kerne moduliert sind (vgl. Abb. 8).

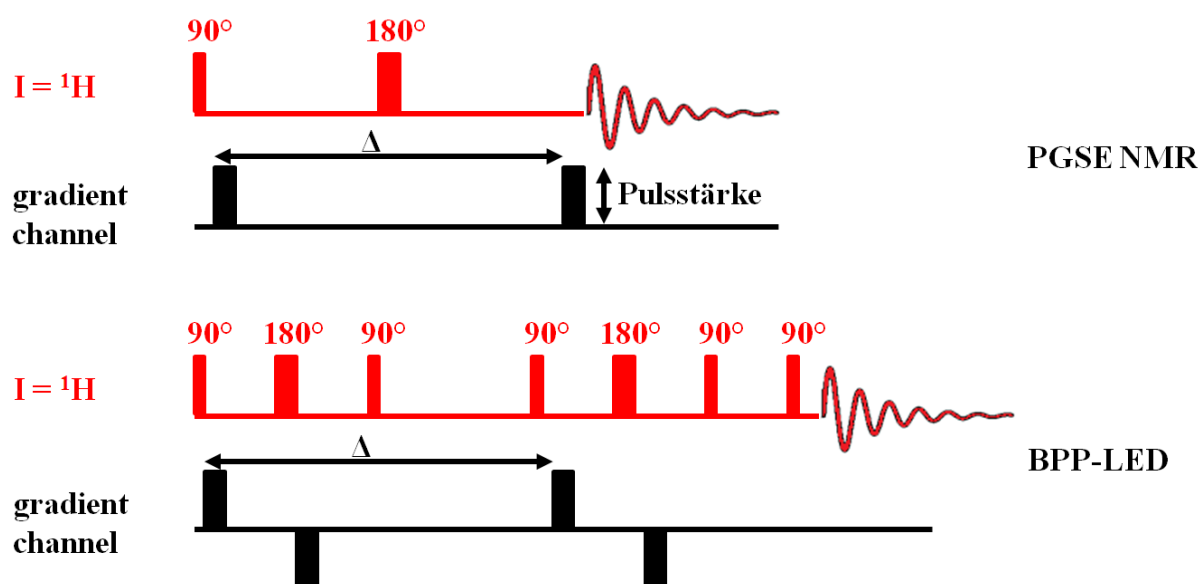


Abb. 9: Darstellung der grundlegenden Pulssequenzen von ^1H -DOSY-Experimenten

Mithilfe zweidimensionaler NMR-Spektroskopie kann auch das Diffusionsverhalten einzelner Probenmoleküle untersucht werden, wobei das Prinzip des hierfür genutzten DOSY-Experimentes (*Diffusion-ordered Spectroscopy*) von den bisher besprochenen 2D-NMR-Verfahren leicht abweicht. Das grundlegende Konzept eines DOSY-Experimentes lässt sich anhand des von STEJSKAL & TANNER, 1965 entwickelten PGSE NMR-Verfahrens (*Pulsed Gradient Spin Echo NMR*) nachvollziehen. Die entsprechende Pulsabfolge ist in Abb. 9 dargestellt. Nach dem initialen 90° -Puls erhält jeder Spin durch einen Gradienten-Puls einen charakteristischen Phasenwinkel, der von der Position des jeweiligen Kernes in z-Richtung

abhängt, wodurch dessen Position zu Beginn des Experimentes quasi kodiert wird. Während der Evolutions-Phase diffundieren die Probemoleküle entsprechend ihrer hydrodynamischen Eigenschaften, bevor durch einen zweiten Gradientenpuls die veränderte Position der Kerne bezüglich der z-Richtung wieder dekodiert und der resultierende FID aufgenommen wird. Für den Erhalt der zweiten Dimension könnte grundsätzlich die Zeit zwischen den beiden Gradientenpulsen schrittweise variiert werden. Aus praktischen Gründen wird jedoch stattdessen zwischen den einzelnen Durchführungen die Stärke des Gradienten verändert, was denselben Effekt hervorruft [Antalek, 2002]. Im Ergebnis des Experimentes werden die einzelnen ^1H -Spektren aller gleich schnell diffundierenden Probenmoleküle mit ihrem jeweiligen Diffusionskoeffizienten korreliert. Die Pulsabfolge des PGSE NMR-Experimentes wurden über die Jahrzehnte vielfach optimiert und durch deutlich komplexere Puls-Sequenzen verdrängt. Eine heutzutage anwendungsrelevante Variante stellt das von WU ET AL., 1995 beschriebene BPP-LED-Verfahren dar (*bipolar pulse pair-longitudinal eddy-current delay*), bei welchem unter anderem jeder der beiden Gradientenpulse jeweils durch ein bipolares Gradientenpulspaar ersetzt wurde (vgl. Abb. 9).

Die Entwicklung von Verfahren zur Bestimmung kompletter 3D-Strukturen von Proteinen aus zweidimensionalen NMR-Spektren ist in hohem Maße mit den Pionierarbeiten der Gruppe um Kurt Wüthrich verbunden, dessen Leistungen mit dem Nobelpreis für Chemie 2002 prämiert wurden. Für die ersten Untersuchungen auf diesem Gebiet diente BPTI (*Bovine pancreatic trypsin inhibitor*), ein globuläres Protein mit 58 Aminosäuren, für welches eine hochaufgelöste Röntgen-Struktur zur Verfügung stand, als Standardmodell [Wüthrich et al., 1982; Billeter et al., 1982; Wagner & Wüthrich, 1982; Ascenzi et al., 2003].

Der erste und häufig aufwändigste Schritt für die 3D-Strukturbestimmung eines Proteins besteht stets in der Erstellung eines möglichst vollständigen, sequenzspezifischen Assignments der einzelnen NMR-Signale, für welchen Zweck anhand von BPTI allgemeine Strategien entwickelt wurden [Wüthrich, 1986; Bax, 1989; Wüthrich, 1990]. Grundsätzlich werden hierzu zunächst auf Basis skalarer Kopplungen (COSY, TOCSY) Korrelationen innerhalb einzelner Aminosäure-Reste ermittelt, bevor diese unter Nutzung dipolarer Kopplungen (NOESY, ROESY) bezüglich ihrer Position innerhalb der Proteinsequenz zugeordnet werden. Heteronukleare Experimente finden für die Absicherung der Zuordnungen Verwendung.

Der zweite Schritt besteht in der Erfassung eines Netzwerkes von Abstandsinformationen zwischen den einzelnen ^1H -Kernen des Proteins auf Basis von NOESY-Spektren. Hierfür ist die sichere Erfassung und korrekte Zuordnung der entsprechenden Kreuzpeaks von zentraler

Bedeutung. Für die Strukturberechnung sind Abstandsinformationen zwischen relativ weit voneinander entfernten Gruppierungen von besonderer Bedeutung, da sie spezielle Faltungen anzeigen, die sich nicht trivial aus der sequentiellen Abfolge der Aminosäuren ergeben. Solche Fernreichweiten-Kontakte ergeben aufgrund der r^{-6} -Beziehung jedoch in der Regel auch besonders intensitätsschwache Signale, sodass ein Verfahren zur Abgrenzung dieser Signale vom spektralen Rauschen von großer Bedeutung ist. Eine sehr sichere und automatisierte Identifikation der Kreuzpeaks gelingt mithilfe einer Software namens ATNOS (*automated NOESY peak picking*) [Herrmann et al., 2002 (1)].

Bei der für Proteine und Peptide typischerweise hohen Anzahl von ^1H -Kernen mit recht ähnlichen chemischen Verschiebungen besteht ein weiterer kritischer Punkt in der eindeutigen Zuordnung der ermittelten NOESY-Kreuzpeaks. Hierfür bietet die Software CANDID (*Combined automated NOE assignment and structure determination module*) ein sehr leistungsfähiges Instrument [Herrmann et al., 2002 (2)]. Mithilfe von CANDID können beispielsweise mit ATNOS ermittelte NOESY-Kreuzpeaks auf Basis einer zuvor zu erstellenden Assignment-Tabelle automatisiert einzelnen Kontakten zugeordnet und anschließend durch Integration die entsprechenden Abstandsinformationen extrahiert werden. Hierbei werden Kreuzpeaks, für welche mehrere Zuordnungsmöglichkeiten existieren zunächst mit allen denkbaren Möglichkeiten erfasst (*ambiguous distance constraints*) und auf Basis mehrerer objektiver Kriterien bezüglich ihres Einflusses auf die Strukturberechnung gewichtet berücksichtigt. Gleichzeitig wird berücksichtigt, dass die Zuordnungen aller Kreuzpeaks eines NOESY-Spektrums nicht unabhängig voneinander sind, sondern summarisch stets ein selbst-konsistentes Netzwerk ergeben müssen (*network-anchoring*). Auf dieser Basis wird eine erste 3D-Strukturberechnung mithilfe eines externen Programmes durchgeführt. Die resultierende Struktur wird anschließend genutzt, um die Zuordnungsmöglichkeiten der *ambiguous distance constraints* einzuschränken, indem die Wichtung der einzelnen Optionen bezüglich ihrer jeweiligen Vereinbarkeit mit der berechneten 3D-Struktur verändert wird. Dieser Prozess wird iterativ in 7 aufeinander folgenden Zyklen wiederholt, wodurch die 3D-Struktur immer stärker eingegrenzt wird.

Der abschließende dritte Schritt besteht schließlich in der Berechnung einer 3D-Struktur unter Verwendung der aus den NOESY-Spektren extrahierten Abstandsinformationen. Hierfür können zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt werden.

Für den als *distance geometry (DG)* bezeichneten Ansatz werden die mittels NMR ermittelten Abstandsdaten mit Abstandsinformationen, die durch die kovalente Struktur vorgegeben sind, zu einer partiellen Abstandsmatrix kombiniert. Fehlende Abstandsdaten werden durch

spezielle Verfahren geschätzt, um eine selbst-konsistente Matrix zu erhalten, mit deren Hilfe eine Struktur in kartesischen Koordinaten generiert wird. Diese Struktur wird anschließend mithilfe diverser Verfahren verfeinert, um eine physikalisch sinnvolle Struktur zu erhalten [Blumenthal, 1970; Williamson et al., 1985].

Eine abgewandelte Variante des *distance geometry*-Ansatzes arbeitet anstelle von kartesischen Koordinaten in einem Winkelraum und basiert auf der Verwendung einer variablen *target function*. Diese wird ausgehend von einer zufälligen Startstruktur entlang der Peptidsequenz schrittweise so gefaltet, dass zunächst nur NMR-Abstandsinformationen zwischen sequentiell nah benachbarten Aminosäureresten berücksichtigt werden, um lokale Faltungen zu generieren. Durch Hinzunahme immer weiter reichender Abstandsinformationen gelingt anschließend die Generierung der Gesamtkonformation [Braun & Go, 1985].

Distance geometry-Varianten sind allerdings verhältnismäßig anfällig dafür, dass die erhaltenen 3D-Strukturen in lokalen Minima der Potential-Energiehyperfläche hängen bleiben und daher nicht die global am besten mit den experimentellen Daten zu vereinbarende Struktur ergeben [Williamson & Waltho, 1992]. *Restrained molecular dynamics (RMD)* bietet diesbezüglich einen überlegenen Ansatz zur Strukturberechnung [Kaptein et al., 1985; Clore et al., 1985; Kaptein et al., 1988]. Bei diesem Verfahren wird bei der Lösung der Newton'sche Bewegungsgleichung neben den klassischen Potentialtermen für z.B. Bindungslängen, Bindungswinkel und -diederwinkel, sowie für van-der-Waals- und Coulomb-Wechselwirkungen ein zusätzlicher Term eingeführt, der ^1H -Kerne zu den NMR-spektroskopisch bestimmten Abständen zieht. Dieses Verfahren wird häufig dahingegen erweitert, dass das System während der Berechnung in mehreren Zyklen abwechselnd durch eine simulierte Zufuhr kinetischer Energie "erhitzt" und anschließend wieder "abgekühlt" wird. Dieses, als *simulated annealing* bezeichnete Prinzip ermöglicht ein Überwinden kleinerer Energiebarrieren und vergrößert damit die Chance, eine Struktur nah am globalen Minimum der aufgespannten Potential-Energiehyperfläche zu finden [Nilges et al., 1988].

Sehr häufig finden sich Kombinationen der verschiedenen Strategien, bei denen beispielsweise eine initiale *distance geometry*-Struktur durch ein zusätzliches *simulated annealing*-Protokoll optimiert wird. Ein frei verfügbares und sehr leistungsfähiges Programmpaket für eine solche Strukturberechnung stellt XPLOR-NIH dar [Schwieters et al., 2003]. Dieses Programmpaket vereinigt zahlreiche NMR-spezifische Algorithmen mit zentralen Komponenten für Kraftfeldoptimierungen und MD-Simulationen, welche ihrerseits auf dem Programmpaket CHARMM (*Chemistry at Harvard Molecular Mechanics*) beruhen [Brooks et al., 1983].

Eine auf diesem Wege bestimmte Proteinstruktur stimmt häufig sehr gut mit korrespondierenden Röntgen-Strukturen überein, weist gegenüber letztgenannter Methode jedoch den erheblichen Vorteil auf, die Struktur direkt in einer Solvensumgebung und ggf. sogar unter annähernd physiologischen Bedingungen betrachten zu können [Bax, 1989; Wüthrich, 1990].

1.4 Aussichtsreiche Partnermoleküle in *drug-delivery* Systemen

1.4.1 Systeme mit Chitosan und anionischen Polyamino­säuren

Seit der Arbeit von KICK, 2007 wurde Chitosan in der Arbeitsgruppe "Wirkungsmodifizierung von Peptidhormonen" an der Professur für Allgemeine Biochemie der TU Dresden intensiv auf seine Eignung als Partnermolekül für die Komplexierung von GnRH-Antagonisten untersucht. Für umfassende Darstellungen zu Eigenschaften und pharmazeutischer Relevanz von Chitosan sei daher neben den allgemeinen Reviews von AMINABHAVI ET AL., 2004, RINAUDO, 2006 und ZARGAR ET AL., 2015 auch auf die entsprechenden arbeitsgruppen-spezifischen Darstellungen zu strukturellen [Beil, 2009] und vorwiegend pharmazeutischen Aspekten [Schamberger, 2014] verwiesen.

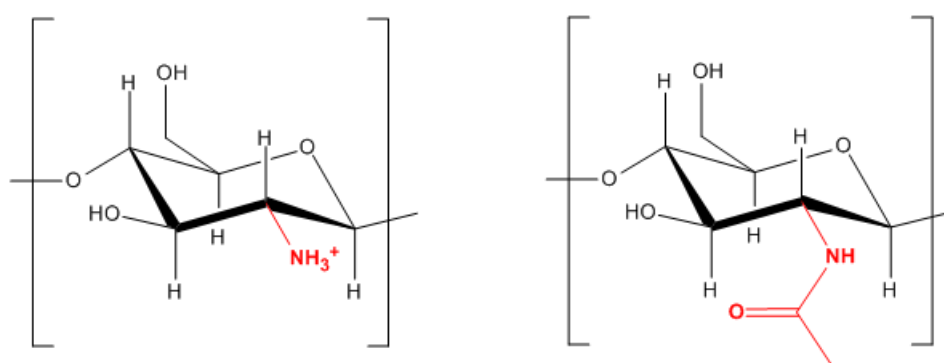


Abb. 10: Strukturformeln der beiden verschiedenen Monomereinheiten von Chitosan (links: β-D-Glucosamin; rechts: N-Acetyl-β-D-Glucosamin)

Chitosane sind β(1→4)-glykosidisch verknüpfte, lineare Copolymere aus β-D-Glucosamin und N-Acetyl-β-D-Glucosamin (vgl. Abb. 10), die durch partielle Deacetylierung aus Chitin gewonnen werden können [Muzzarelli, 1977]. Aufgrund der nahezu unbegrenzten Verfügbarkeit von Chitin aus maritimen Quellen und dessen unkomplizierter Umsetzbarkeit zu Chitosan stellt letzteres einen äußerst attraktiven Rohstoff dar [Jeuniaux & Voss-Foucart,

1991]. Die freien Aminogruppen weisen in Abhängigkeit vom N-Acetylierungsgrad pK_s-Werte zwischen 6,17 und 7,32 auf [Domard, 1987; Chen et al., 2006], wobei das Polysaccharid unterhalb dieses Wertes recht gut in wässrigen Solventien löslich ist [Kumar et al., 2004].

Chitosan selbst verfügt über eine hohe Bio- und Blutkompatibilität [Baney et al., 2004; Chen & Tianqing, 2008] und wird *in vivo* zu den toxikologisch unbedenklichen Monomeren abgebaut [Nicol, 1991]. Da es darüber hinaus eine ausgesprochen starke Mucoadhäsivität zeigt [Lehr et al., 1992] und inzwischen belegt wurde, dass es durch Störung von *tight junctions* die Permeabilität von Epithelschichten drastisch erhöht [Smith et al., 2004], hat sich ein erhebliches Forschungsinteresse bezüglich des Einsatzes von Chitosan in *drug delivery*-Systemen entwickelt [Aminabhavi et al., 2004]. Inzwischen wurden vielfältige pharmakologisch relevante Effekte mit Chitosan in Zusammenhang gebracht, so auch ein positiver Einfluss auf die Tumorthherapie [Tokoro et al., 1988].

Als reaktiver Angriffspunkt für kovalente Modifizierungen ist die freie Aminogruppe der deacetylierten Untereinheiten prädestiniert und wurde auch vielfältig genutzt [Alves & Mano, 2008]. Von besonderem Stellenwert in Hinblick auf die vorliegende Arbeit sind die Bestrebungen, Tanninspezies kovalent an dem Polysaccharid zu fixieren. In der Gruppe um Svetlana Zivanovic gelang es bereits, Gallussäure über eine Aktivierung der Säuregruppe mittels EDC und NHS an Chitosan zu binden und die antioxidativen Eigenschaften des resultierenden Materials zu charakterisieren [Schreiber, 2012; Guo, 2015]. Es wurde auch eine enzymatische Variante zur Anbindung von Gallussäure unter Verwendung der Laccase aus *Trametes versicolor* beschrieben [Božič et al., 2012 (1)], wobei jedoch infolge einer initialen Chinonbildung die kovalente Bindung in diesem Fall zwischen dem phenolischen Ring der Gallussäure und der Aminogruppe des Chitosans zustande kommt. Dieses Prinzip sollte sich daher auch auf Gallotannine anwenden lassen, was allerdings aufgrund der auftretenden Hydrolyse des Tannins bisher nicht gelungen ist [Božič et al., 2012 (2)].

Die anionischen Polyaminosäuren Poly-L-Glutamat und Poly-L-Aspartat wurden bereits durch MURGAS, 1997 als potentielle Komplexparker für Cetorelix untersucht, wobei sich zeigte, dass in Abhängigkeit von der Molekülmasse Depotsysteme mit unterschiedlich retardierter Freisetzung generierbar sind und der hydrophobere Charakter von Poly-L-Glutamat zu einem stärker ausgeprägten Retardeffekt führt. Spätere Strukturuntersuchungen legten zudem nahe, dass Poly-L-Glutamat den Aggregationszustand von Cetorelix beeinflusst [Beil, 2012(1)].

Der kombinierte Einsatz von Chitosan und den genannten anionischen Polyaminosäuren zur Komplexierung von GnRH-Antagonisten in sogenannten "Sandwich-Komplexen" führte zu einer deutlichen Erhöhung der Freisetzungverzögerung des Wirkstoffes gegenüber Systemen mit nur einem der beiden Partnermoleküle [Kick, 2007; Schamberger, 2014], was durch die unter veränderten Präparationsbedingungen aus den gleichen Komponenten erzeugten "Nanosphären" noch einmal überboten werden konnte [Schamberger, 2014].

1.4.2 Alginsäure und Hyaluronsäure

Im Gegensatz zu Chitosan stellen Alginsäure und Hyaluronsäure unter physiologischen Bedingungen anionische Polysaccharide dar, welche insbesondere aufgrund der Fähigkeit, Hydrogele zu bilden, und ihrer ausgesprochen hohen Mucoadhäsivität für *drug delivery*-Systeme von Interesse sind [Sosnik et al., 2014].

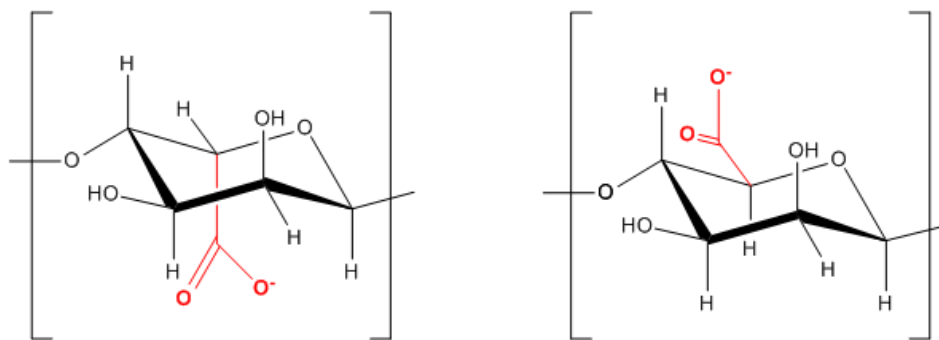


Abb. 11: Strukturformeln der beiden verschiedenen Monomereinheiten von Alginat (links: α -L-Guluronsäure; rechts: β -D-Mannuronsäure)

Alginsäuren sind lineare Polysaccharide, die aus (1 \rightarrow 4)-glykosidisch verknüpften α -L-Guluronsäure- und β -D-Mannuronsäure-Einheiten aufgebaut sind, wobei die einzelnen Monomere sowohl geblockt als auch alternierend auftreten (vgl. Abb. 11). In kommerziellen Mengen wird Alginat vorwiegend aus Braunalgen wie beispielsweise *Laminaria hyperborea* gewonnen [Moen et al., 1997]. Es gilt als sehr gut biokompatibel und ist nach US-Recht als *GRAS* (*Generally Recognized As Safe*) eingestuft [Lee & Mooney, 2012]. Mitunter wurde eine verstärkte Zytokin-Produktion bei Alginat-Applikation beobachtet und daher auf die Induktion einer unerwünschten Immunantwort hingewiesen [Otterlei et al., 1991], wobei inzwischen davon ausgegangen wird, dass diese Beobachtungen nicht auf Alginsäure selbst,

sondern auf mitisolierte Kontaminationen zurückzuführen sind [Orive et al., 2002]. Ganz im Gegenteil wurden alginat-basierte Systeme beschrieben, mit deren Hilfe eine Transplantation endokriner Zellen unter Vermeidung von Abstoßungsreaktionen gelingt, sodass für eine derartige Therapie keine begleitende Immunsuppression erforderlich ist [de Vos et al., 2006].

Für die Generierung pharmazeutischer Formulierungen mit Alginat als Trägermaterial wird häufig die seit langem bekannte Hydrogelbildung in Gegenwart zweiwertiger Ionen, wie beispielsweise Ca^{2+} , ausgenutzt [Grant et al., 1973], wobei nanoporöse Strukturen mit Porendurchmessern von etwa 5 nm entstehen [Boontheekul et al., 2005]. Um die Wirkstofffreisetzung verzögern zu können, wurden Gele mit zusätzlichen kovalenten Quervernetzungen beschrieben, die kleinere Prorengößen aufweisen [Maiti et al., 2009]. Von besonderer Bedeutung sind Alginatformulierungen zur beschleunigten Wundheilung [Gilchrist & Martin, 1983; Catanzano et al., 2015].

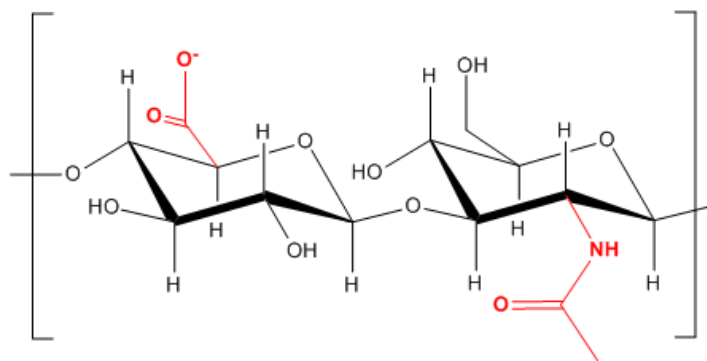


Abb. 12: Strukturformel der Disaccharideinheit von Hyaluronsäure, bestehend aus $\beta(1\rightarrow3)$ -glykosidisch mit N-Acetyl- β -D-Glucosamin verknüpfter β -D-Glucuronsäure

Hyaluronsäure ist ebenfalls ein lineares Polysaccharid, welches jedoch im Unterschied zu Alginsäure eine definierte Abfolge aus β -D-Glucuronsäure und N-Acetyl- β -D-Glucosamin aufweist. Die genannten Monomere treten konsequent alternierend auf und sind abwechselnd durch $\beta(1\rightarrow4)$ -glykosidische bzw. $\beta(1\rightarrow3)$ -glykosidische Bindungen miteinander verknüpft (vgl. Abb. 12). Die Gewinnung im industriellen Maßstab wird häufig biotechnologisch durch Fermentation von *Streptococcus zooepidemicus* realisiert [Liu et al., 2011], wobei es aufgrund der von diesem Stamm produzierten Endotoxine Anstrengungen gibt, die Produktion in unbedenlicheren, rekombinanten Organismen zu ermöglichen [Widner et al., 2005; Yu & Stephanopoulos, 2008].

Hyaluronsäure wird in einem großen Umfang für die Behandlung von Gelenksarthrosen durch intraartikuläre Injektion eingesetzt [Strauss et al., 2009], da bereits seit Jahrzehnten bekannt ist, dass die Hyaluronsäurekonzentration der Synovialflüssigkeit infolge einer rheumatoiden Arthritis signifikant abnimmt [Balazs et al., 1967]. Allerdings wurde die Wirksamkeit dieser Therapievariante immer wieder in Frage gestellt [Lo et al., 2003; Arrich et al., 2005].

Hyaluronsäure spielt in vielen Phasen von Tumorerkrankungen eine herausgehobene Rolle [Toole, 2004]. Die Produktion dieses Polysaccharides ist in der überwältigenden Mehrheit maligner Tumore stark erhöht, wodurch es mitunter einen prädiktiven Charakter bezüglich der Bösartigkeit solcher Gewebe besitzt [Toole et al., 2002]. Die Hyaluronsäurekonzentration in Serum bzw. Urin von Tumorpatienten ist dementsprechend häufig erhöht [Delpach et al., 1990; Lokeshwar et al., 2002] und ist indikativ für ein Voranschreiten der Krankheit [Ropponen et al., 1998; Setälä et al., 1999]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine künstliche Erhöhung der Hyaluronsäureproduktion durch Transfektion mit cDNA entsprechender Hyaluronsäure-Synthasen Wachstum und Metastasierung von Brust- und Prostatakarzinomen verstärken [Itano et al., 1999; Liu et al., 2001], wohingegen eine analoge Reduktion des Hyaluronsäuregehaltes durch Hyaluronidasen das Tumorstadium signifikant reduziert [Shuster et al., 2002]. Die Wirkung von Hyaluronsäure wird in diesem Kontext vorwiegend auf die Aktivierung anti-apoptotischer Signalwege durch Bindung an die in Tumorgeweben überproduzierten Rezeptoren CD-44 und RHAMM (*Receptor for Hyaluronan Mediated Motility*) zurückgeführt [Turley et al., 2002; Toole, 2004]. Es wurde aber beispielsweise auch eine beschleunigte Angiogenese durch Hyaluronsäure-Oligosaccharide beschrieben [Lees et al., 1995].

Für *drug delivery*-Systeme bietet die Interaktion mit den genannten Rezeptoren allerdings auch Chancen, da z.B. infolge der spezifischen Bindung von Hyaluronsäure an den CD-44-Rezeptor und die dabei induzierte Endozytose eine gezielte, intramolekulare Wirkstoffapplikation möglich erscheint [Choi et al., 2012; Oyarzun-Ampuero et al., 2013].

1.4.3 Tannine als potentielle Partnermoleküle

Tannine stellen eine Gruppe pflanzlicher Polyphenole dar, die in verschiedenen Geweben von vorwiegend dikotylen Spezies vorkommen, wobei besonders hohe Tanningehalte in Pflanzengallen zu finden sind [Haslam, 2007]. Bereits FREUDENBERG, 1920 nahm eine grundlegende Einteilung der Tannine in einerseits hydrolysierbare und andererseits flavonoidbasierte, kondensierte Vertreter vor, wobei für die vorliegende Arbeit nur die erstgenannte

Gruppe relevant ist. Für kommerzielle Zwecke werden hydrolysierbare Tannine in der Regel aus Sumachgewächsen (*Anacardiaceae*), wie z.B. *Rhus chinensis* oder *Rhus typhina*, oder Buchengewächsen (*Fagaceae*), wie beispielsweise *Quercus robur* oder *Quercus infectoria*, isoliert [Grundhöfer et al., 2001; Haslam, 2007].

Die bedeutendste Gruppe innerhalb der hydrolysierbaren Tannine stellen die sogenannten Gallotannine dar, welche sich dadurch auszeichnen, dass ein zentraler Polyalkohol (i.d.R. β -D-Glukose) mit einer differierenden Anzahl an Gallussäure-Einheiten (3,4,5-Trihydroxybenzoesäure) verestert vorliegt. Hierbei kann jede angeknüpfte Gallussäure-Einheit wiederum über eine ihrer phenolischen OH-Gruppen mit einer zusätzlichen Gallussäure-Einheit verbunden sein, wodurch in entsprechenden Pflanzenextrakten stets komplexe Gemische solcher Verbindungen vorliegen. Die spezielle Esterbindung unter Beteiligung der phenolischen OH-Gruppe wurde diesbezüglich bereits durch FISCHER, 1914 als Depsid-Bindung bezeichnet.

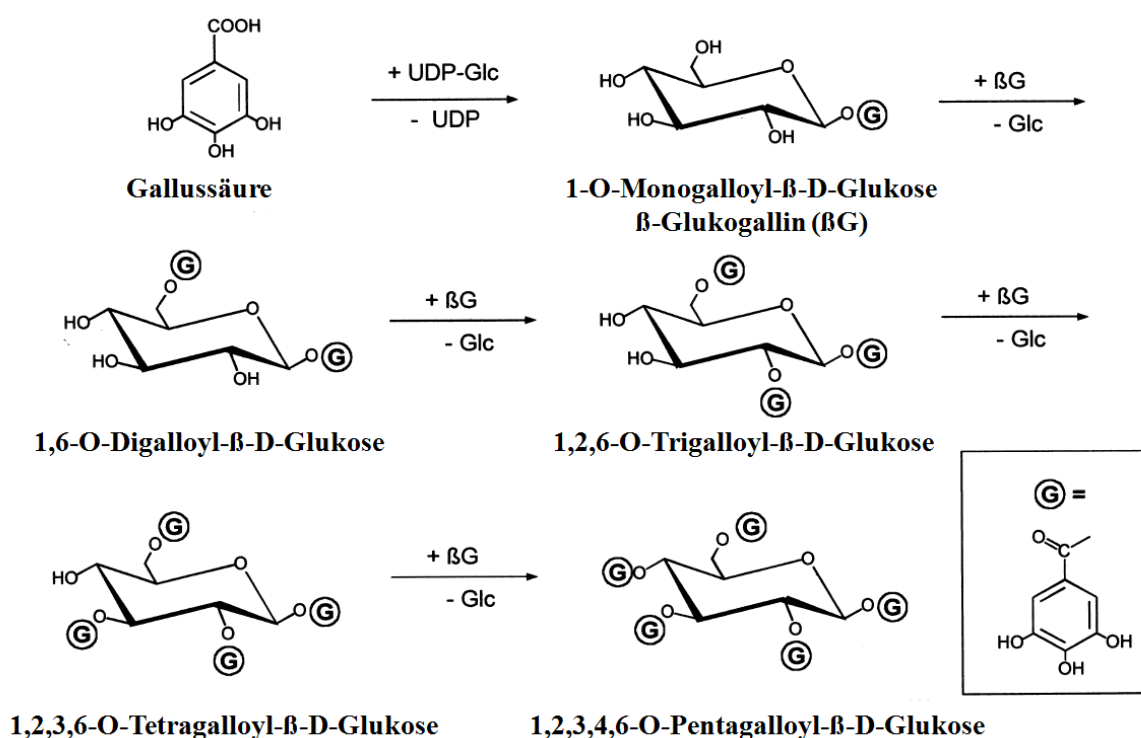


Abb. 13: Schema der gerichteten Galloylierung im Zuge der Biosynthese von 1,2,3,4,6-O-Pentagalloyl- β -D-Glukose (PGG) [modifiziert nach: Grundhöfer et al., 2001]

Die Biosynthese der Gallotannine wird seit längerem intensiv untersucht, wobei sich gezeigt hat, dass die schrittweise Galloylierung der zentralen β -D-Glukose durch Glykosyltransferasen in vielen Organismen gerichtet abläuft (vgl. Abb. 13) [Grundhöfer et al., 2001].

Die initiale Reaktion führt demnach zur Bildung von 1-O-Monogalloyl- β -D-glukose (β -Glukogallin) aus UDP-Glukose und Gallussäure [Gross, 1983 (1)]. Der sich anschließende Galloylierungsschritt des β -Glukogallins zu 1,6-O-Digalloyl- β -D-Glukose kann durch die entsprechende Transferase *in vitro* ohne zusätzlichen Cofaktor katalysiert werden, was zu der Schlussfolgerung führte, dass β -Glukogallin in dieser Reaktion selbst auch als acylierende Spezies fungiert [Gross, 1983 (2)]. Untersuchungen von DENZEL & GROSS, 1991 konnten überdies belegen, dass einzelne Transferasen auch 1,6-O-Digalloyl- β -D-Glukose als acylierende Spezies unter Bildung von 6-O-Monogalloyl- β -D-glukose verwenden können, obgleich die Reaktivität durch die zusätzliche Gallussäure-Einheit gegenüber β -Glukogallin bereits deutlich verringert ist, weshalb allgemein angenommen wird, dass noch höher galloylierte Spezies selbst nicht mehr als acylierende Spezies wirken können und β -Glukogallin grundsätzlich präferiert wird [Grundhöfer et al., 2001]. Durch sukzessive Veresterung der noch freien OH-Gruppen der zentralen β -D-Glukose wird gemäß Abb. 13 1,2,3,4,6-O-Pentagalloyl- β -D-Glukose (PGG) aufgebaut [Cammann et al., 1989], welche im Anschluss durch verschiedene Transferasen unter Bildung von Depsidbindungen weiter galloyliert werden kann [Niemetz & Gross, 1999].

Häufig werden neben den klassischen Gallotanninen auch Spezies gefunden, bei welchen räumlich benachbarte Gallussäure-Einheiten durch eine kovalente C-C-Bindung miteinander verbunden sind. Bei der Hydrolyse dieser Verbindungen wird infolge einer spontan auftretenden Laktonisierung der dabei entstehenden Hexahydroxydiphensäure stets Ellagsäure detektiert, was zu der Bezeichnung "Ellagitannine" führte [Haslam, 1989].

Tannine sind insbesondere deshalb zunehmend in den Fokus pharmazeutischer Forschung gerückt, weil sie mit der Wirksamkeit zahlreicher traditioneller Medizinprodukte speziell aus dem asiatischen Raum in Verbindung gebracht werden [Haslam, 1996; Yang & Liu, 2014]. Inzwischen wurden für Tannine antioxidative [Gülçin et al., 2010], antiinflammatorische [Mota et al., 1985], antibakterielle und antivirale [Scalbert, 1991; Buzzini et al., 2008], sowie Antitumor-Effekte [Kashiwada et al., 1992; Cai et al., 2004] wiederholt belegt. Von besonderem Interesse ist dabei die seit langem bekannte, intensive Interaktion von Tanninen mit Proteinen, die häufig zur Bildung eines präzipitierenden Komplexes aus beiden Komponenten führt [Hagerman & Butler, 1978]. Diese Interaktion kann jedoch gleichzeitig in den Aggregationsprozess von Peptiden und Proteinen eingreifen, sodass die Bildung stabiler Amyloidfibrillen unterbunden wird [Ehrnhöfer et al., 2008]. Für die in grünem Tee vorkommende Tanninspezies Epigallocatechingallat (EGCG) wurde diesbezüglich eine destabilisierende Wirkung auf die mit der Alzheimer-Erkrankung in Zusammenhang

stehenden Amyloid- β -Fibrillen konstatiert [Bieschke et al., 2010]. Für Gallotannine ist das Bild hingegen uneinheitlich. Während ONO ET AL., 2004 eine Destabilisierung von Amyloid- β -Fibrillen durch eine Gallotanninmischung beschrieben, kamen BOYÉ-HARNASCH & CULLIN, 2006 zu dem Ergebnis, dass eine gleichartige Gallotanninmischung die Amyloidbildung des Prion-Proteins HET-s signifikant verstärkt. Neueren Studien zufolge besitzt Gallussäure selbst auch eine gewisse inhibitorische Wirksamkeit auf die Amyloid-Bildung verschiedener Proteine und Peptide [Liu et al., 2013; Jayamani & Shanmugan, 2014].

Tanninhaltige Präparate wurden bereits im zweiten Weltkrieg in großem Umfang zur Behandlung von Brandwunden erfolgreich eingesetzt. Die dafür notwendige, langfristige Applikation durch wiederholte subkutane Injektionen führte jedoch mitunter zu schweren Lerbenschäden bei den Patienten [Korpásky & Mosonyi, 1950; Korpásky, 1959]. In der Folge wurden immer wieder hepatotoxische und sogar karzinogene Effekte durch tanninhaltige Pflanzenextrakte beschrieben [Wang et al., 1976], was jedoch durch systematische Studien mit reinen Gallotanninmischungen an Ratten in keiner Weise bestätigt werden konnte [Onodera et al., 1994] und wohl in den meisten Fällen auf Substanzen zurückzuführen ist, die in den jeweiligen Pflanzenextrakten mit den Tanninen assoziiert vorliegen [Chung et al., 1998]. Daher ist das Interesse an einem realen pharmazeutischen Einsatz von Tanninen in den letzten Jahren wieder in den Vordergrund gerückt. So wurden beispielsweise jüngst pH-sensitive *drug-delivery*-Systeme mit nicht-kovalent verbundenen Mehrschichtsystemen aus Gallotanninen mit Chitosan bzw. mit Poly-N-Vinylpyrrolidon beschrieben [Shutava & Lvov, 2006; Liu et al., 2014]. Die aus solchen Systemen stets in größeren Mengen freigesetzte Gallussäure gilt als weitestgehend unbedenklich. So wurde im Tiermodell bei oraler Applikation für Gallussäure ein NOAEL (*no-observed-adverse-effect level*) von > 5000 mg/kg Körpergewicht bei subakuter Gabe festgestellt [Rajalakshmi et al., 2001] und ein NOAEL > 119 mg/d/kg Körpergewicht bei subchronischer Applikation über 13 Wochen [Niho et al., 2001].

Um die beschriebenen Nebenwirkungen von Tanninpräparaten möglichst gering zu halten oder gar vermeiden zu können, wäre es notwendig, die komplexen, aus Pflanzen isolierten Gemische in klar definierte Tanninfraktionen aufzutrennen und Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufzuklären. Bereits bei der Extraktion von Tanningemischen aus Pflanzengewebe kann dabei durch die Wahl des verwendeten Lösemittels eine gewisse Selektivität erzielt werden, sodass in methanolischen Extrakten eine Anreicherung von niedrig galloylierten Spezies beobachtet wird, während in korrespondierenden Extraktionsschritten

mit Aceton oder Essigsäureethylester deutlich mehr hoch-galloylierte Vertreter zu finden sind [Markom et al., 2007].

Für die weitere Trennung extrahierter Gallotannine hat die Chromatographie an Sephadex LH-20 weite Verbreitung gefunden [Nishizawa et al., 1982]. Dabei werden die Tannine zunächst in ethanolischer Lösung am Säulenmaterial adsorbiert und anschließend durch Variation des Wasser- und Acetongehaltes des Laufmittels schrittweise wieder eluiert, wodurch eine gewisse Fraktionierung, jedoch keinesfalls eine Isolierung reiner Spezies möglich wird. Nichtsdestotrotz konnten mit diesem Prinzip jedoch Tendaussagen zur Abhängigkeit der antioxidativen Wirkung von der Struktur der Tannine getroffen werden [Tian et al., 2009].

Einen Ansatz zur Gewinnung reiner Tanninspezies lieferten CHEN & HAGERMAN, 2004 durch ein Verfahren, welches die selektive Spaltung der Depsidbindungen unter Erhalt der klassischen Esterbindungen in einem methanolischen Solvensgemisch ausnutzt, wodurch zumindest 1,2,3,4,6-O-Pentagalloyl- β -D-Glukose (PGG) in hoher Reinheit zugänglich ist.

2 Zielstellung

Antagonisten des Gonadotropin-Releasing Hormons (GnRH) sind von hoher pharmazeutischer Relevanz im Bereich der Reproduktionsmedizin und bei der Behandlung hormonabhängiger Tumorerkrankungen. Hoch potente Vertreter dieser Gruppe synthetischer Dekapeptide wurden bereits Ende der 1980er bzw. zu Beginn der 1990er Jahre durch die Gruppe um den Nobelpreisträger Andrzej W. Schally entwickelt und seitdem sehr intensiv erforscht. Jedoch stehen einer verbreiteten Anwendung dieser Wirkstoffe in der Tumorthherapie bis heute zwei ungelöste Probleme im Wege.

Zum einen ist für einen effektiven Einsatz von GnRH-Antagonisten eine Applikation des Wirkstoffes über sehr lange Zeiträume von mehreren Wochen bis hin zu Monaten erforderlich, weshalb die Entwicklung einer Langzeitdepot-Formulierung mit kontrolliertem Freisetzungsverhalten dringend erforderlich ist. Zum anderen aggregieren diese Peptide unter physiologischen Bedingungen sehr schnell zu unlöslichen Fibrillen, was eine erhebliche Beeinträchtigung der Bioverfügbarkeit mit sich bringt.

Es ist daher Anliegen der vorliegenden Arbeit, die strukturellen Ursachen und die Abläufe der beobachteten Aggregation auf molekularer Ebene zu ergründen und daraus geeignete Strategien abzuleiten, um diese Vorgänge unterdrücken zu können. Darauf aufbauend sollen Komplexsysteme aus GnRH-Antagonisten mit biophilen Partnermolekülen generiert und charakterisiert werden, welche das Potential besitzen, unter physiologischen Bedingungen eine kontrollierte Freisetzung des Wirkstoffes über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten.

Es ergeben sich daher folgende Zielstellungen für die vorliegende Arbeit:

- 1) Die Struktur und der Bildungsprozess von GnRH-Antagonisten-Aggregaten soll auf molekularer Ebene untersucht werden, wobei insbesondere die Aufklärung der Monomerkonformationen und eine detaillierte Untersuchung auftretender Sekundärstrukturveränderungen im Zuge der Aggregatbildung im Fokus stehen. Ziel ist ein genaues Verständnis des Ablaufes der Aggregation und seiner strukturellen Ursachen.
- 2) In analoger Weise sollen Untersuchungen zur Aggregation eines GHRH-Analogons durchgeführt werden, um Aussagen über die Verallgemeinerungsfähigkeit einzelner Aspekte des Aggregationsprozesses von GnRH-Antagonisten zu gewinnen.

- 3) Unter Berücksichtigung der gewonnenen Erkenntnisse über die molekularen Ursachen dieser Peptidaggregationsvorgänge sollen biophile Partnermoleküle identifiziert und charakterisiert werden, welche die Aggregation hemmen können.
- 4) Partnermoleküle mit einer inhibitorischen Wirkung auf die Aggregation von GnRH-Antagonisten sollen für die Komplexierung dieser Peptide genutzt werden. Die erhaltenen Komplexe sind strukturell und bezüglich ihrer Wirkstofffreisetzung zu charakterisieren.
- 5) Durch systematische Untersuchungen an Komplexen aus GnRH-Antagonisten und Polysacchariden, für welche bereits ein verzögernder Effekt auf die Freisetzung von GnRH-Antagonisten in vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe um Dr. Naumann beschrieben wurde, sollen Aggregation und Freisetzungsverhalten dieser Systeme auf molekularer Ebene analysiert werden.
- 6) Schlussendlich sollen Versuche unternommen werden, aggregations-inhibierende Partnermoleküle mit Polysacchariden auf nicht-kovalentem und kovalentem Wege zu kombinieren, um Freisetzungsprofile bewusst beeinflussen zu können.
- 7) Für die Realisierung der vorgenannten Teilziele sind adäquate analytische Methoden zu entwickeln und zu etablieren.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

3.1.1 Lyophilisierte Peptidhormone

- Cetrorelix-Acetat, Charge: BER 1243, Peptidgehalt: 88,5 %, Aeterna Zentaris GmbH
- Ozarelix-Acetat, Charge: 0662048 und Charge: 0562048, Peptidgehalt: 88,3 %, Aeterna Zentaris GmbH
- Teverelix-Acetat, Charge: Ber x 1495 (EP24332-379), Peptidgehalt: 90 %, Aeterna Zentaris GmbH
- Teverelix-Trifluoracetat, Charge: EP243325-450, Peptidgehalt: 88,1 %, Aeterna Zentaris GmbH
- Cetrorelix-Fragment Cx[1-4] (amidiertes C-Terminus), D-50848, Aeterna Zentaris GmbH
- Cetrorelix-Fragment Cx[1-6] (amidiertes C-Terminus), D-50849, Aeterna Zentaris GmbH
- Cetrorelix-Fragment Cx[1-9] (amidiertes C-Terminus), D-50850, Aeterna Zentaris GmbH
- geschütztes Cetrorelix-Derivat (^tBu-Schutzgruppen an Ser⁴ und Tyr⁵, DG-420099, Aeterna Zentaris GmbH
- GHRH-Analogon nach Peptidsyntheseverfahren 1 als Trifluoracetat, Biscayne Pharmaceuticals
- GHRH-Analogon nach Peptidsyntheseverfahren 2 als Acetat, Trifluoracetat und Hydrochlorid, Biscayne Pharmaceuticals

3.1.2 Weitere Feststoffe

- 1-Hydroxybenzotriazol, 98 %, Acros Organics
- Ammonium-1,8-anilino-naphthalinsulfonat (ANS), Fluka
- Ammoniumacetat, reinst, 98 %, Grüssing GmbH
- Amylopektin, rein, zur Verfügung gestellt von Dipl.-Ing. A. Seifert, TU Dresden
- Amylose, rein, zur Verfügung gestellt von Dipl.-Ing. A. Seifert, TU Dresden
- Bernsteinsäure, p.a., VEB Laborchemie Apolda

3 Material und Methoden

- Bernsteinsäureanhydrid, zur Synthese, Merck KGaA
- Chitosan (low molecular weight: 50 - 190 kDa), Sigma-Aldrich Chemie GmbH
- D/L-Weinsäure, p.a., VEB Laborchemie Apolda
- Dextran (40 kDa), aus *Leuconostoc* spp., Sigma-Aldrich Chemie GmbH
- D-Gluconsäurelaktone, 99 - 100 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH
- Eisen(III)-chlorid, wasserfrei, 98 %, Acros Organics
- Embonsäure, zur Synthese, Merck-Schuchard
- Gallussäure, DAB, Nickel-Chemie
- Hyaluronsäure, 2 Da - 800 kDa, Serva Feinbiochemica
- Kongorot, Laborbestand
- L(+)-Ascorbinsäure, p.a., VK Labor- und Feinchemikalien
- lösliche Stärke, VEB Laborchemie Apolda
- L-Tyrosin, reinst, VEB Berlin Chemie
- N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid HCl (EDC), zur Synthese, Sigma-Aldrich Chemie GmbH
- Natrium-Alginat, (Protefix-Haftpulver), Queisser Pharma
- Natriumchlorid, 99,9 %, VWR Prolabo
- Natrium-Poly-L-Glutamat (3 kDa - 15 kDa), Sigma-Aldrich Chemie GmbH
- Ovalbumin, durch Studenten vor Ort isoliert
- Phosphorpentoxid, Riedel-de Haën
- Sephadex LH-20, Pharmacia Fine Chemicals
- Tannin, rein, gepulvert, Merck KGaA
- Thioflavin T, Sigma-Aldrich Chemie GmbH
- Zitronensäure, reinst, wasserfrei, 99 %, Grüssing GmbH

3.1.3 Lösungsmittel und Reagenzien

- 1,2-Propandiol, p.a., 99,5 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH
- Aceton, Carl Roth GmbH & Co. KG
- Acetonitril, reinst, Merck KGaA
- Ameisensäure, Laborbestand
- Ammoniaklösung, 31,1 %, VWR
- Benzylalkohol, rein, VEB Jenapharm Laborchemie Apolda
- Deuteriumoxid, 99,9 Atom-% D, Sigma-Aldrich Chemie GmbH

- Diethylether, 99,5 %, Carl Roth GmbH & Co. KG
- Dimethylsulfoxid (hexadeuteriert), 99,8 % + 0,03 % TMS, Deutero GmbH
- Dimethylsulfoxid, 100 %, VWR Prolabo
- entionisiertes Wasser, Hausanlage
- Essigsäure (Eisessig), Carl Roth GmbH Co. KG
- Essigsäureanhydrid, 99 %, Grüssing GmbH
- Essigsäureethylester, Carl Roth GmbH & Co. KG
- Ethanol, vergällt, 99 %, Carl Roth GmbH & Co. KG
- Methanol, HPLC gradient grade, VWR Prolabo
- n-Propanol, reinst, 99 %, Grüssing GmbH
- Reinstwasser, Hausanlage (Millipore-Reinstwasseranlage)
- Salzsäure, 35,7 %, VWR
- Trifluoressigsäure, for spectroscopy, Merck KGaA
- Wasser, für LC/MS, Promochem LGC Standards GmbH
- Methanol, für LC/MS, Promochem LGC Standards GmbH
- Methansäure, für LC/MS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH

3.2 Geräte und Software

3.2.1 ATR-FTIR-Spektrometer

- FTIR-Spektrometer Impact 400 D, Nicolet
- Golden Gate Einfachreflexions-Diamant-ATR-Aufbau
- Steuerungs- und Auswertesoftware: OMNIC 4.1 a, Nicolet

3.2.2 Chromatographie-Anlage zur Trennung der Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* an Sephadex LH-20

- Schlauchpumpe Econo Pump Model EP-1, Bio-Rad
- Chromatographie-Säule mit Sephadex LH-20, 200 x 30 mm, 80 ml-Gelvolumen in 99 % Ethanol
- UV-Detektor samt Monitor Econo UV Monitor Model EM-1, Bio-Rad
- Datenschreiber Econo Recorder Model 1327, Bio-Rad

3.2.3 Isokratische HPLC-Anlage zur Peptidquantifizierung (1)

- Online-Entgaser DEGASYS DG-1210, Gamma Analysen Technik (GAT)
- HPLC-Pumpe LC 1110, ICI Instruments
- manuelles Einspritzventil (Sechs-Wege-Ventil), Valco Instruments
- HPLC-Säule Eurosphere - 100 C C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm, Knauer
- variabler Wellenlängendetektor LCD 500, Gamma Analysen Technik (GAT)
- Data Interface DP 800, Gamma Analysen Technik (GAT)
- Steuerungs- und Auswertesoftware: ICI DP 800 Chromatography Data Station V 2.50, ICI Instruments

3.2.4 Isokratische HPLC-Anlage zur Peptidquantifizierung (2)

- Online-Entgaser K-5020, Knauer
- HPLC-Pumpe Programmable Solvent Module 116 (System Gold), Beckman
- Autosampler Autoinjector 234, Abimed Gilson
- HPLC-Säule Eurosphere - 100 C C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm, Knauer
- Säulenofen, Gamma Analysen Technik
- UV-Detektor Programmable UV Module 166 (System Gold), Beckman
- Interface Remote Interface Module, Beckman Coulter
- Steuerungs- und Auswertesoftware: 32 Karat V 5.0, Beckman Coulter

3.2.5 Gradienten-HPLC-Anlage zur Tanninanalytik (1)

- Online-Entgaser K-5020, Knauer
- HPLC-Pumpe Programmable Solvent Module 126 (System Gold), Beckman
- Autosampler Autoinjector 234, Abimed Gilson
- HPLC-Säule NUCLEOSIL 100-5-C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm, Bischoff
- Säulenofen, Gamma Analysen Technik
- UV-Detektor Programmable UV Module 166 (System Gold), Beckman
- Interface Remote Interface Module, Beckman Coulter
- Steuerungs- und Auswertesoftware: 32 Karat V 5.0, Beckman Coulter

3.2.6 Gradienten-HPLC-Anlage zur Tanninanalytik (2)

- Online-Entgaser K-5020, Knauer
- HPLC-Pumpe Programmable Solvent Module 126 (System Gold), Beckman
- Autosampler Autoinjector 234, Abimed Gilson
- HPLC-Säule NUCLEOSIL 100-5-C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm, Bischoff
- Säulenofen HP Series 1100, Hewlett-Packard
- DAD-Detektor Diode Array Detector Module 168 (System Gold), Beckman
- Interface Remote Interface Module, Beckman Coulter
- Steuerungs- und Auswertesoftware: 32 Karat V 5.0, Beckman Coulter

3.2.7 Semi-präparative HPLC-Anlage zur Tannintrennung

- Online-Entgaser K-5020, Knauer
- 2 HPLC-Pumpen LC 1110, ICI Instruments
- Gradientenmischer mit manuellem Einspritzventil LC 1430, ICI Instruments
- HPLC-Säule LiChroprep RP-8, 250 x 20 mm, 5 - 20 µm, Knauer
- Rapid-Scan UV-Detektor GAT-PHD 601, Gamma Analysen Technik
- Fraktionssammler Model 2128, Bio-Rad
- Data Interface DP 800, Gamma Analysen Technik (GAT)
- Steuerungs- und Auswertesoftware: ICI DP 800 Chromatography Data Station V 2.50, ICI Instruments

3.2.8 LC-MS/MS-Anlage

- Online-Entgaser Vacuum Degasser G1322A (1100 series), Agilent
- HPLC-Pumpe Quaternary Pump G1311A (1100 series), Agilent
- Autosampler G1313A (1100 series), Agilent
- HPLC-Säule NUCLEOSIL 100-5-C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm, Bischoff
- Massenanalysator 3200 LC-MS/MS-Q-Trap, AB Sciex
- Steuerungs- und Auswertesoftware: Analyst, AB Sciex

3.2.9 Fluoreszenz-Spektrometer

- Fluoreszenzspektrophotometer F-4500, Hitachi
- Lichtquelle: Xenon-Bogenlampe (150 W)
- Monochromator: aberration-corrected concave diffraction grating
- Detektor: Photomultiplier
- Steuerungs- und Auswertesoftware: FL Solutions, Hitachi

3.2.10 Single Photon Counting Cell für TCSPC-Messungen

- Single Photon Counting Cell FluoroCube, Horiba Jobin Yvon
- Controller FluoroHub, Horiba Jobin Yvon
- Lichtquelle: NanoLED-280, UV pulsed LED source
- Detektor: TBX Picosecond Photon Detection Module, Horiba Jobin Yvon
- Steuerungssoftware: DataStation und DAS6, Horiba Jobin Yvon

3.2.11 UV/VIS-Spektrometer

- Einstrahl-UV/VIS-Spektrometer Specord S 100 B, Analytik Jena
- UV-Lichtquelle: Deuteriumdampf Lampe DO 249 TJ
- Detektor: Diode Array Detector
- Steuerungs- und Auswertesoftware: WinASPECT Plus V 1.7, Zeiss

3.2.12 NMR-Spektrometer

- 600 MHz-NMR-Spektrometer Avance III 600, Bruker
- Steuerungssoftware: TopSpin, Bruker

3.2.13 Transmissions-Elektronen-Mikroskop

- TEM Libra120, Zeiss
- Illuminationssystem: LaB₆ Gun
- Steuerungs- und Auswertesoftware: WinTEM und iTEM, Zeiss

3.2.14 Weitere Geräte

- Feinwaagen Modelle BP3100S, BP221S und MC1, Sartorius
- Gefriertrocknungsanlage ALPHA 2-4, Christ Gefriertrocknungsanlagen mit Drehschieberpumpe RZ 2, Vacuubrand
- Magnetrührwerke Modelle 2002, 3000, 3001, 3002 und 3003, Heidolph
- Mikroskop Model DMB-1223, Motic GmbH
- pH-Meter Model 320, Mettler Toledo mit Elektrode InLab414, Mettler Toledo
- Rotationsverdampfer Rotavapor R-200, BÜCHI mit Wasserbad B-490, BÜCHI und Vakuumpumpe MZ2C mit elektronisch schaltbarem Ventil CVC 24, Vacuubrand
- Thermomixer Model 5436, Eppendorf
- Ubbelohde-Viskosimeter, Kapillargröße 0,63 mm, SCHOTT
- Ultraschall-Heizbad Sonorex Super RK 103H, Bandelin
- Zentrifugen Megafuge 1.0, Heraeus Instruments und Centrifuge 5415D, Eppendorf

3.3 Bestimmung der GnRH-Antagonisten-Konzentration mithilfe isokratischer HPLC

3.3.1 Parameter der Bestimmungen

Die Quantifizierung des Peptidgehaltes in Lösungen von GnRH-Antagonisten wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit an zwei verschiedenen HPLC-Anlagen realisiert. Die Parameter zur Durchführung der Messung an der in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen HPLC-Anlage der Firma Gamma Analysen Technik Jena GmbH sind Tabelle 1 zu entnehmen, während die entsprechenden Parameter für die Messung an der in Abschnitt 3.2.4 beschriebenen HPLC-Anlage der Firma Beckman

Tabelle 2 entnommen werden können.

Tabelle 1: Parameter der Bestimmung des Peptidgehaltes in Lösungen von GnRH-Antagonisten mithilfe der isokratischen HPLC-Anlage 1 der Firma Gamma Analysen Technik Jena GmbH

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
Fluss	1 ml/min	Programmzeit	10 min
Druck	8 - 10 MPa	Trennmethode	isokratisch
Temperatur	25 °C	mobile Phase	65 % Reinstwasser, 35 % Acetonitril, 0,1 % Trifluoressigsäure
Detektionswellenlänge	217 nm		
Injektionsvolumen	20 µl		

Tabelle 2: Parameter der Bestimmung des Peptidgehaltes in Lösungen von GnRH-Antagonisten mithilfe der isokratischen HPLC-Anlage 1 der Firma Beckman

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
Fluss	1 ml/min	Programmzeit	10 min
Druck	1,2 - 1,6 kpsi	Trennmethode	isokratisch
Temperatur	25 °C	mobile Phase	65 % Reinstwasser, 35 % Acetonitril, 0,1 % Trifluoressigsäure
Detektionswellenlänge	217 nm		
Injektionsvolumen	20 µl		

3.3.2 Kalibrierungen zur Peptidgehaltsbestimmung in Lösungen von GnRH-Antagonisten

Die Bestimmung des GnRH-Antagonisten-Gehaltes mithilfe der in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen HPLC-Anlage erfolgte lediglich in der Anfangsphase der vorliegenden Arbeit und ist daher nur für die Ergebnisse im Zusammenhang mit dem Phasenverhalten der GnRH-Antagonisten, deren Verhalten in Gegenwart von Chitosan, Stärkekomponten und der ungetrennten Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis*, sowie den TCSPC-Messungen an Teverelix-Proben von Bedeutung.

Die Kalibrierreihen der GnRH-Antagonisten Cetrorelix, Ozarelix und Teverelix werden jeweils durch Verdünnen einer Stammlösung der Acetat-Form des entsprechenden Peptides in 0,1 M Essigsäure hergestellt. Dabei werden jeweils äquidistant 10 Proben zwischen 0,0075 mg/ml und 0,0750 mg/ml in Dreifachansätzen gemischt und vor Durchführung der Messung für 7 Tage bei Raumtemperatur inkubiert.

Für Cetrorelix ergibt sich unter den vorgegebenen Bedingungen auf dieser HPLC-Anlage eine Retentionszeit von 4,8 min und die folgende Kalibriergerade:

$$\frac{\text{Peakfläche}}{\text{a.u.}} = 39.512.000 \frac{c(\text{Cetrorelix})}{\text{mg/ml}} - 5.800; R^2 = 0,9925$$

Für Ozarelix ergibt sich unter den vorgegebenen Bedingungen auf dieser HPLC-Anlage eine Retentionszeit von 6,2 min und die folgende Kalibriergerade:

$$\frac{\text{Peakfläche}}{\text{a.u.}} = 40.162.000 \frac{c(\text{Ozarelix})}{\text{mg/ml}} + 17.400; R^2 = 0,9917$$

Für Teverelix ergibt sich unter den vorgegebenen Bedingungen auf dieser HPLC-Anlage eine Retentionszeit von 5,0 min und die folgende Kalibriergerade:

$$\frac{\text{Peakfläche}}{\text{a.u.}} = 41.867.000 \frac{c(\text{Teverelix})}{\text{mg/ml}} + 23.000; R^2 = 0,9954$$

Für die Kalibrierung der Konzentrationsbestimmung der GnRH-Antagonisten mithilfe der in Abschnitt 3.2.4 beschriebenen HPLC-Anlage werden die gleichen Kalibrierproben in 0,1 M Essigsäure hergestellt, die bereits im Zusammenhang mit der erstgenannten HPLC-Anlage dargestellt wurden.

Abb. 14 zeigt eine Auswahl der resultierenden Chromatogramme der Kalibrierreihe von Cetrorelix. Die Chromatogramme zeigen jeweils einen schulterfreien Peak, der an beiden Enden zur Basislinie zurückkehrt. Die Retentionszeit beträgt in diesem Fall 4,3 min. Die Gleichung der Kalibriergerade lautet:

$$\frac{\text{Peakfläche}}{\text{a.u.}} = 104.270.000 \frac{c(\text{Cetrorelix})}{\text{mg/ml}} + 60.700; R^2 = 0,9939$$

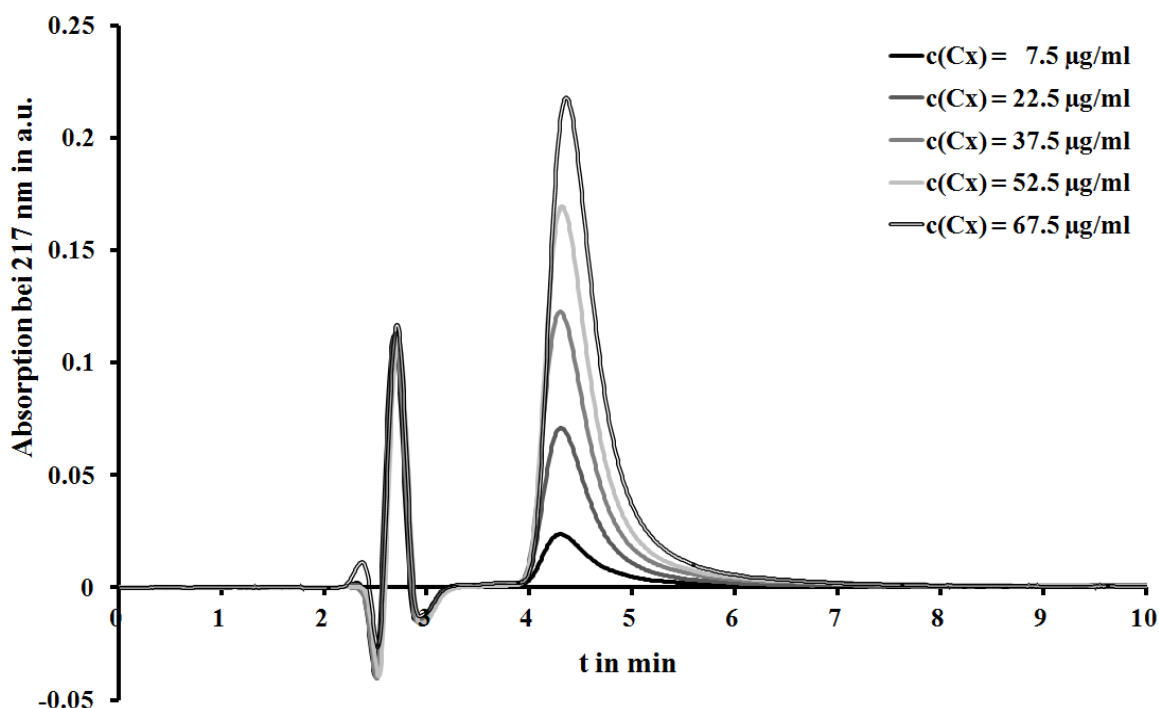


Abb. 14: HPLC-Chromatogramme der Kalibrierung zur Cetrorelix-Gehaltsbestimmung an der HPLC-Anlage 2 der Firma Beckman

Abb. 15 demonstriert an ausgewählten Beispielen das Erscheinungsbild der Chromatogramme der Ozarelix-haltigen Proben. Der zu integrierende Peak von Ozarelix wird bei 5,0 min beobachtet und lässt stets eine konstante Schulter bei 4,3 min erkennen, was mutmaßlich auf Cetrorelix-Anteile aus dem isokratisch im Kreislauf geführten Laufmittel zurückzuführen ist, welche beim Einspritzen der Probe mit dem Ozarelix interagieren und dann mit der Probe über die Säule transportiert werden. Die Schulter wird aus der Flächenintegration herausgerechnet. Die Gleichung der auf diese Weise ermittelten Kalibriergeraden lautet:

$$\frac{\text{Peakfläche}}{\text{a.u.}} = 101.330.000 \frac{c(\text{Ozarelix})}{\text{mg/ml}} + 59.900; R^2 = 0,9976$$

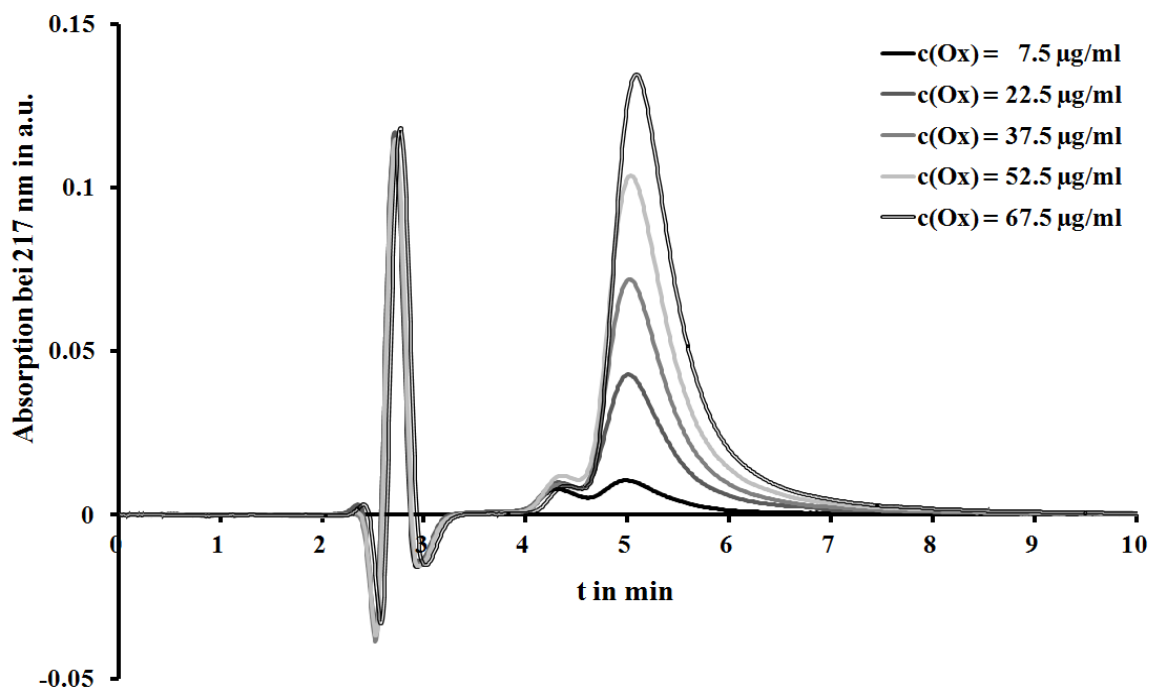


Abb. 15: HPLC-Chromatogramme der Kalibrierung zur Ozarelix-Gehaltsbestimmung an der HPLC-Anlage 2 der Firma Beckman

Für Teverelix wird das Auftreten einer Schulter bei 4,3 min insbesondere bei niedrigen Konzentrationen ebenfalls beobachtet, wie Abb. 16 verdeutlicht. Die Retentionszeit von Teverelix liegt jedoch mit 4,7 min deutlich näher an der von Cetrorelix, wodurch bei höheren Konzentrationen die Schulter nicht mehr vom eigentlichen Peak der Probe zu unterscheiden ist. Daher wird die Schulter in diesem Fall nur für niedrige Peptidkonzentrationen bei der Integration berücksichtigt.

Die Kalibriergerade folgt in diesem Fall folgender Beziehung:

$$\frac{\text{Peakfläche}}{\text{a.u.}} = 99.893.000 \frac{c(\text{Ozarelix})}{\text{mg/ml}} + 60.700; R^2 = 0,9960$$

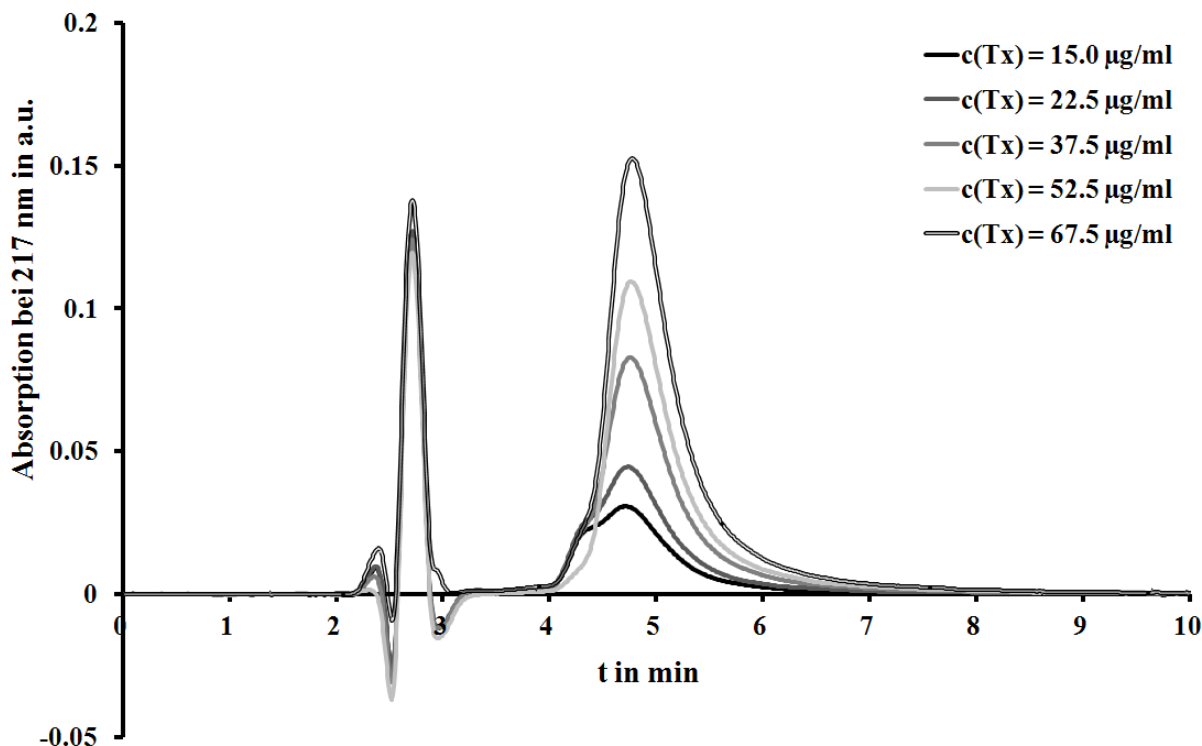


Abb. 16: HPLC-Chromatogramme der Kalibrierung zur Teverelix-Gehaltsbestimmung an der HPLC-Anlage 2 der Firma Beckman

Die Messdaten und Kalibriergeraden samt Standardabweichungen können der Anhang-DVD aus dem Ordner "Peptidquantifizierung" entnommen werden.

3.4 ATR-FTIR-Spektroskopie

3.4.1 Geräteparameter

Die Parameter für die ATR-FTIR-spektroskopische Untersuchung von GnRH-Antagonisten und deren Komplexen wurden bereits in der vorgelagerten Masterarbeit optimiert und daher unverändert aus BEIL, 2012(1) übernommen. Tabelle 3 fasst die verwendeten Einstellungen zusammen.

Tabelle 3: Geräte-Parameter der ATR-FTIR-spektroskopischen Untersuchungen

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
Lichtquelle	IR	Irisblende	23,03	Fourier-Transformations - Stützpunkte	16384
ATR- Kristall	Typ- IIa- Diamant	Hochpassfilter	200	Stützpunkte Laserfrequenz	15798 cm ⁻¹
Kristall-anordnung	Einfachreflexion, $\alpha = 45^\circ$	Tiefpassfilter	90000	Position Interferogrammpeak	1024
Anpressstempel	Saphir	Bereich	4000 – 650 cm ⁻¹	Apodisation	Happ-Genzel
Detektor	DTGS	Zubehör	Stickstoff-spülung	Scans für Background	128
Strahlteiler	KBr	Scans	128	Verstärkung für Background	1
Sample Spacing	2	Auflösung	4 cm ⁻¹	Background	Luft
A/D Wandler Bits	16	Zerofilling	1 Level	Anpressdruck	6 Nm
Spiegel-geschwindigkeit	0,6329	Anzahl der Datenpunkte	5408	Korrektur	keine

3.4.2 Messungen zur pH- und Zeitabhängigkeit der Sekundärstrukturverteilung der GnRH-Antagonisten und des GHRH-Analogons, sowie Messungen an lyophilisierten Proben

Da durch das Prinzip der Lyophilisation auch alle Lösungsbestandteile, die neben der zu untersuchenden Probe als Begleitstoffe enthalten sind, in der finalen Probe verbleiben, werden für die Präparation sämtlicher lyophilisierter Proben für ATR-FTIR-Messungen ausschließlich Begleitsubstanzen eingesetzt, die entweder aufgrund eines leichtflüchtigen Charakters bereits während der Lyophilisation entfernt werden oder selbst keine Banden im relevanten Wellenzahlbereich aufweisen.

Für die ATR-FTIR-spektroskopischen Untersuchungen zur Abhängigkeit der Sekundärstrukturverteilung der GnRH-Antagonisten Cetrorelix, Ozarelix und Teverelix vom pH-Wert und von der Inkubationszeit werden jeweils Stammlösungen mit einer effektiven Peptidkonzentration von 0,1 mg/ml in verdünnter Salzsäure (pH 2,0) hergestellt. Unter konstantem Rühren und fortwährender pH-Kontrolle durch ein pH-Meter werden durch tropfenweise Zugabe von verdünnter Ammoniaklösung nacheinander die pH-Werte 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 und 7,0 eingestellt. Bei jedem pH-Wert werden jeweils 6 Aliquote zu 500 µl entnommen und in einzelne 1,5-ml-Eppendorf-Vials überführt. Für jeden pH-Wert werden je 2 der genannten Aliquote für 24 h, 2 weitere für 7 Tage und die letzten 2 Aliquote für 14 Tage bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und nach Ende der entsprechenden Lagerungsdauer bei -32 °C tiefgefroren und anschließend lyophilisiert.

Für die Untersuchungen zur pH- und Zeitabhängigkeit der Sekundärstrukturverteilung des GHRH-Analogons wird eine Stammlösung mit einer effektiven Peptidkonzentration von 33,3 µg/ml in verdünnter Salzsäure (pH 3,0) hergestellt und unter Rühren und ständiger pH-Kontrolle an einem pH-Meter durch schrittweise Zugabe von verdünnter Ammoniaklösung auf die pH-Werte 3,0, 5,0, 7,0 und 9,0 eingestellt. Bei Erreichen der entsprechenden pH-Werte werden jeweils 6 Aliquote zu je 500 µl in 1,5-ml-Eppendorf-Vials überführt. Von diesen werden je 2 Aliquote für 24 h, 2 weitere für 7 Tage und die verbleibenden 2 Aliquote für 14 Tage bei 4 °C im Kühlschrank gelagert, bevor die Proben bei -32 °C tiefgefroren und anschließend lyophilisiert werden.

Weiterhin wird eine Charge Amylopektin, welches von Dipl.-Ing. A. Seifert frisch aus Stärke isoliert wurde, zu 1 mg/ml in Reinstwasser unter konstantem Rühren suspendiert und auf 5 Aliquote aufgeteilt. Je ein Aliquot wird für 1 Tag, 2 Tage, 3 Tage, 6 Tage bzw. 10 Tage bei RT inkubiert, anschließend bei -32 °C tiefgefroren und lyophilisiert.

Desweiteren werden bereits lyophilisiert bezogene Proben der Peptide aus der Peptidsynthese sowie Lyophilisate einzelner in Reinstwasser gelöster Polysaccharide und die lyophilisierten finalen Tanninspezies der Methanolyse der Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* untersucht.

Die ATR-FTIR-spektroskopische Messung aller lyophilisierten Proben erfolgt unter konstantem Druck durch Einspannung der jeweiligen Probe zwischen dem Messkristall (Diamant) und dem Anpressstempel (Saphir) der ATR-Apparatur. Die Probenmessung erfolgt in diesem Fall einmalig und ohne Trocknungszeit, da aus der Gefriertrocknung unter den genannten Bedingungen homogene und annähernd maximal getrocknete Proben resultieren. Die erhaltenen ATR-FTIR-Spektren werden ohne Glättung einer linearen Basislinienkorrektur zwischen den Punkten bei 3800 cm⁻¹, 1750 cm⁻¹, 1200 cm⁻¹ und 800 cm⁻¹ unterzogen bzw. zum Zweck der Sekundärstrukturanalyse zusätzlich zwischen den Punkten bei 1750 cm⁻¹ und 1570 cm⁻¹.

3.4.3 Messungen an gefällten Peptid-Aggregaten und Komplexen

Die Probenpräparation für ATR-FTIR-spektroskopischen Untersuchungen an gefällten Proben wird stets in zwei Schritten realisiert. Im ersten Schritt erfolgt die Fällung der jeweiligen Probe und die Abtrennung des Präzipitats durch Zentrifugation. Der zweite Schritt besteht aus einer dreifach wiederholten Waschprozedur aus 2-minütigem Rühren des Präzipitats in 5 ml Reinstwasser und anschließender Abtrennung des Wassers durch Zentrifugation. Die

Waschprozedur ist notwendig, um IR-aktive Zusatzstoffe, die für die Einstellung der Fällungsbedingungen benötigt werden, vor der ATR-FTIR-spektroskopischen Messung zu entfernen. Dabei ist insbesondere die Entfernung von Ammoniumacetat von Bedeutung, wie in der vorgelagerten Masterarbeit ausführlich dargestellt wurde [Beil, 2012(1)]. Der obligatorische Waschschrift wird im Folgenden nicht mehr explizit erwähnt.

Für die ATR-FTIR-spektroskopischen Untersuchungen zur Sekundärstrukturverteilung in Aggregaten der GnRH-Antagonisten Cetrorelix, Ozarelix und Teverelix, sowie der N-terminalen Cetrorelix-Fragmente Cx[1-4], Cx[1-6] und Cx[1-9] und des zweifach tert-Butyl-geschützten Cetrorelix-Derivates DG-420099 werden jeweils 0,5 mg des lyophilisierten Peptides in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) gelöst und deren Aggregate durch Einstellung des pH-Wertes auf pH 7,0 durch Zutropfen von 1 M Ammoniaklösung gefällt.

Für die Untersuchung des Aggregatspektrums des GHRH-Analogons werden 50 µg des lyophilisierten Acetates des GHRH-Analogons, welches nach Peptidsyntheseverfahren 2 hergestellt wurde, in 500 µl einer 0,9 %igen NaCl-Lösung in Reinstwasser gelöst und anschließend durch Zugabe von 5 µl einer Kongorot-Lösung (1 mg/ml in Reinstwasser) gefällt.

Komplexe aus Amylose und Cetrorelix werden bei zwei verschiedenen pH-Werten untersucht. Zum einen werden je 0,5 ml einer Cetrorelix-Stammlösung zu 1 mg/ml in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) und einer analogen Amylose-Stammlösung zu 1 mg/ml in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) vereinigt, gut durchmischt und nach 1 h das Präzipitat ohne weitere pH-Veränderung abzentrifugiert. Desweiteren werden die genannten Cetrorelix- und Amylose-Stammlösungen zunächst bei pH 3,0 in der Form zusammenpipettiert, dass in je 1 ml Gesamtvolumen Amylose/Cetrorelix-Massenverhältnisse von 80/20, 65/35 und 35/65 erreicht werden. Im Anschluss erfolgt jeweils eine Einstellung der Proben auf pH 7,0 durch Zugabe einer vorher titrierten Menge an Ammoniaklösung. Die Fällungsprodukte werden nach 1 h abzentrifugiert.

Komplexe von Cetrorelix mit Chitosan (low molecular weight), Dextran (40 kDa) und mit löslicher Stärke werden ebenfalls in der Form hergestellt, dass zunächst Stammlösungen zu 1 mg/ml in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) angesetzt und anschließend jeweils Cetrorelix- und Polysaccharid-Stammlösung in 1 ml Gesamtvolumen so vermischt werden, dass Massenverhältnisse von Polysaccharid zu Cetrorelix von 80/20, 60/40, 40/60 und 20/80 resultieren. Die Fällung erfolgt stets durch Zugabe einer vorher titrierten Menge an Ammoniaklösung. Die Fällungsprodukte werden nach 1 h abzentrifugiert.

Im Rahmen der Untersuchungen zur Trocknung von Amylose wird eine 1 %ige Lösung von Amylose in Reinstwasser mit 70 Vol.-% Aceton versetzt, wodurch eine Fällung der Amylose induziert wird. Das Fällungsprodukt wird abweichend vom sonst angewendeten Verfahren nicht mit Reinstwasser, sondern viermal mit Aceton gewaschen und an der Luft bei RT 24 h getrocknet.

Zur Untersuchung von Komplexen aus Cetorelix und der ungetrennten Gallotanninmischung in Abhängigkeit von den Präparationsbedingungen wird für Cetorelix eine Stammlösung zu 0,9 mg/ml und für die Gallotanninmischung eine Stammlösung zu 2,7 mg/ml jeweils in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) hergestellt. Für das erste Experiment werden von jeder Stammlösung je 0,5 ml zusammengegeben, gut durchmischt und anschließend durch Zugabe von verdünnter Ammoniaklösung auf pH 7,0 eingestellt. Der gefällte Komplex wird nach 1 h durch Zentrifugation separiert. Für das zweite Experiment werden 0,5 ml beider Stammlösungen zunächst separat durch Zugabe von verdünnter Ammoniaklösung auf pH 7,0 eingestellt und nach 1 h Äquilibrationszeit vereinigt, gut durchmischt und nach 1 h der gefällte Komplex abgetrennt. Im dritten Experiment wird 1 mg lyophilisiertes Cetorelix-Acetat in 1 ml der zuvor auf pH 7,0 eingestellten Gallotannin-Stammlösung gelöst. Der Komplex wird nach 1 h abzentrifugiert. Im vierten Experiment werden zunächst Cetorelix- und Gallotannin-Stammlösung, wie für das erste Experiment beschrieben, bei pH 3,0 vereinigt und anschließend neutralisiert. Danach werden jedoch sofort 0,5 ml einer Poly-L-Glutamat-Stammlösung von 1,8 mg/ml in Reinstwasser hinzugefügt, gut durchmischt und nach 1 h der Komplex durch Zentrifugation gewonnen. Für das fünfte Experiment wird zunächst verfahren wie im zweiten Experiment, d.h. Cetorelix- und Gallotannin-Lösung werden zunächst separat neutralisiert und erst anschließend vermischt. Danach wird die resultierende Mischung jedoch sofort mit 0,5 ml der beschriebenen Poly-L-Glutamat-Stammlösung versetzt, gut durchmischt und der Komplex nach 1 h abzentrifugiert.

Für die Untersuchungen der Komplexe der GnRH-Antagonisten Cetorelix, Ozarelix und Teverelix mit den Tanninfraktionen TaF1, TaF2, TaF3 und TaF4 und deren durch semi-präparative HPLC erhaltenen Teilfraktionen TaF1 Peak1, TaF1 Peak2, TaF2 Peak1, TaF2 Peak2, TaF2 Peak 3, TaF3 Peak1, TaF3 Peak2, TaF3 Peak 3, TaF4 Peak1, TaF4 Peak2 und TaF4 Peak 3 werden für alle GnRH-Antagonisten Stammlösungen zu 1 mg/ml in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) und für alle Tanninfraktionen und -teilfraktionen Stammlösungen zu 1 mg GAE/ml in Reinstwasser angesetzt. Für alle Kombinationen aus GnRH-Antagonisten und Tanninlösungen werden je 0,5 ml der Peptid-Stammlösung und 0,5 ml der Tannin-Stammlösung vereinigt, gut durchmischt, durch Zugabe einer vorher titrierten Menge an

verdünnter Ammoniaklösung auf pH 7,0 eingestellt und nach 1 h Inkubationszeit abzentrifugiert.

Nach den entsprechenden Waschschritten werden die noch feuchten Proben auf den ATR-Kristall aufgetragen und unter konstantem Druck getrocknet, um die Oberflächenbedeckung des Kristalls und damit verbunden die Signalintensität zu verbessern. Dabei erfolgt alle 5 min die Aufnahme eines Spektrums bis kein trocknungsbedingter Unterschied zwischen aufeinander folgenden Spektren mehr auftritt. Die ATR-FTIR-Spektren werden ohne Glättung einer linearen Basislinienkorrektur zwischen den Punkten bei 3800 cm^{-1} , 1750 cm^{-1} , 1200 cm^{-1} und 800 cm^{-1} unterzogen. Alle in dieser Arbeit diskutierten ATR-FTIR-Spektren können ebenfalls der Anhang-DVD unter "ATR-FTIR-Spektroskopie" entnommen werden.

3.4.4 Bandenformanalyse zur Untersuchung der Sekundärstruktur von GnRH-Antagonisten

Die Sekundärstrukturverteilung von GnRH-Antagonisten wird im Rahmen dieser Arbeit durch Bandenzerlegung der experimentell bestimmten Amid I-Bande des entsprechenden Peptides ermittelt. Die Amid I-Bande wird zu diesem Zweck durch eine begrenzte Anzahl an Gauss-Funktionen beschrieben, die jeweils einem Sekundärstrukturmerkmal zuzuordnen sind. Die dafür verwendete Gauss-Funktion entspricht der in Gl. 4 dargestellten Form.

$$f(\bar{\nu}) = a \cdot e^{-\frac{(\bar{\nu} - \bar{\nu}_{max})^2}{2\sigma^2}} \quad (\text{Gl. 4})$$

mit	a	variabler Koeffizient
	$\bar{\nu}$	Wellenzahl
	$\bar{\nu}_{max}$	Wellenzahl am Bandenmaximum
	σ	Streuung (Breite der Bande)

Die in Gl. 4 beschriebene Funktion $f(\bar{\nu})$ ist ein Maß für die wellenzahlabhängige Infrarotabsorption einer Teilbande der Amid I-Bande, die sich einem bestimmten Sekundärstrukturmerkmal zuordnen lässt. $\bar{\nu}_{max}$ und σ stellen charakteristische Kennwerte der entsprechenden Teilbanden dar und werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit anhand der optimalen Beschreibung der Amid I-Banden von GnRH-Antagonisten und deren Fragmenten empirisch bestimmt. Diese so erhaltenen Kennwerte sind für die untersuchten GnRH-Antagonisten in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4: Übersicht der empirisch bestimmten Parameter der Gauss-Funktionen zur Beschreibung der Amid I-Teilbanden der einzelnen Sekundärstrukturmerkmale von GnRH-Antagonisten

GnRH-Antagonist	β-Faltblatt Typ 1		β-Faltblatt Typ 2		Zufallsknäuel		Prolinartige Struktur	
	$\bar{\nu}_{max}/\text{cm}^{-1}$	σ/cm^{-1}	$\bar{\nu}_{max}/\text{cm}^{-1}$	σ/cm^{-1}	$\bar{\nu}_{max}/\text{cm}^{-1}$	σ/cm^{-1}	$\bar{\nu}_{max}/\text{cm}^{-1}$	σ/cm^{-1}
Cetrorelix	1632	11	1619	10	1658	15	1680	13
Ozarelix	1638	11	1629	10	1658	15	1680	13
Teverelix	1632	11	1619	10	1658	15	1680	13
DG-420099	1638	11	1629	10	1658	15	1680	13

Die in Tabelle 4 aufgeführten Parameter werden für alle Sekundärstrukturberechnungen verwendet mit Ausnahme der direkt aus der Peptidsynthese stammenden, bei sehr niedrigem pH-Wert lyophilisierten Cetrorelix-Acetat- und Ozarelix-Acetat-Proben. Für diese beiden Proben müssen unter Beibehaltung aller anderen Kennwerte die Wellenzahl am Maximum der Zufallsknäuel-Teilbande auf 1650 cm^{-1} und die Streuung der Zufallsknäuel-Bande auf 19 cm^{-1} bzw. auf 24 cm^{-1} verändert werden, da die Peptide in diesem Fall in einer ungeordneten Zufallsstruktur vorliegen, die sonst nicht beobachtet wird.

Durch Aufsummierung der jeweiligen 4 sekundärstrukturspezifischen Teilbanden wird die gesamte Amid I-Bande beschrieben, wobei der variable Koeffizient a aus Gl. 4 den relativen Anteil einer jeden Teilbande an der gesamten Amid I-Bande widerspiegelt. Daher ist es für die Ermittlung der Sekundärstrukturverteilung einer bestimmten Probe notwendig, die Koeffizienten a aller Teilbanden systematisch so zu variieren, dass die erhaltene Summenkurve der Gauss-Kurven die experimentell bestimmte Amid I-Bande möglichst genau beschreibt. Zu diesem Zweck werden mithilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Excel für jede experimentell erfasste Wellenzahl zwischen 1589 cm^{-1} und 1752 cm^{-1} einerseits die gemessenen Absorptionswerte der im Bereich der Amid I-Bande linear basislinienkorrigierten Spektren und andererseits die nach Gl. 4 berechneten Werte der sekundärstrukturspezifischen Teilbanden und der daraus resultierenden Summenkurve dargestellt, wobei die Koeffizienten a der einzelnen Teilbanden in separaten Zellen zunächst willkürlich mit jeweils 0,3 vorgegeben werden. Die Abweichung zwischen experimentell bestimmter und aus der Summe von Gauss-förmigen Teilbanden berechneter Amid I-Bande wird im Bereich zwischen 1606 cm^{-1} und 1694 cm^{-1} mittels Fehlerquadrat-Methode berechnet. Im Anschluss erfolgt eine Minimierung der Fehlerquadratsumme mittels Solver-Funktion, wobei die Zellen, welche die Werte der Koeffizienten a enthalten, als veränderliche, jedoch zwingend positive Werte aufgeführt werden. Nach der iterativen Lösung werden die resultierenden Teilbanden integriert und die relativen Flächen als Maß für die Sekundärstrukturverteilung verwendet.

Die für diese Berechnung notwendigen Microsoft Excel-Vorlagen und die Microsoft Excel-Dokumente mit den Ergebnisse der in dieser Arbeit beschriebenen Bandenzerlegungen können der Anhang-DVD unter "ATR-FTIR-Spektroskopie/Sekundärstrukturberechnung" entnommen werden.

3.4.5 Bandenformanalyse zur Untersuchung der Sekundärstruktur von GHRH-Analoga

Die Bestimmung der Sekundärstrukturverteilung in Proben des GHRH-Analogons folgt grundsätzlich dem in Abschnitt 3.4.4 beschriebenen Verfahren. Allerdings werden in diesem Fall keine zwei unterscheidbaren β -Faltblatt-Strukturen erkannt, sondern neben einer β -Faltblatt-Struktur eine potentiell α -helikale Struktur. Weiterhin wird in diesem Fall von einer β -Turn-artigen Struktur ausgegangen anstelle einer prolinartigen Struktur. Tabelle 5 stellt die zur Berechnung herangezogenen Kennwerte der sekundärstrukturspezifischen Teilbanden dar.

Tabelle 5: Übersicht der empirisch bestimmten Parameter der Gauss-Funktionen zur Beschreibung der Amid I-Teilbanden der einzelnen Sekundärstrukturmerkmale des GHRH-Analogons

Peptid	β -Faltblatt		potentielle α -Helix		Zufallsknäuel		β -Turn-artige Struktur	
	$\bar{\nu}_{max}/\text{cm}^{-1}$	σ/cm^{-1}	$\bar{\nu}_{max}/\text{cm}^{-1}$	σ/cm^{-1}	$\bar{\nu}_{max}/\text{cm}^{-1}$	σ/cm^{-1}	$\bar{\nu}_{max}/\text{cm}^{-1}$	σ/cm^{-1}
GHRH-Analogon	1626	7	1652	12	1645	28	1670	18

Die für diese Berechnungen verwendeten Microsoft Excel-Vorlagen und -Ergebnis-Dokumente können der Anhang-DVD unter "GHRH-Analogon/ATR-FTIR-Spektroskopie" entnommen werden.

3.4.6 Bestimmung des Ethanol-Gehaltes von Ethanol-Wasser-Gemischen mittels ATR-FTIR-Spektroskopie

Im Rahmen der Untersuchungen zum Phasenverhalten von GnRH-Antagonisten in Ethanol-Wasser-Gemischen wird ein schnelles Verfahren zur Bestimmung der Zusammensetzung dieser binären Mischung benötigt. Zu diesem Zweck werden aus Reinstwasser und 99 %igem vergällten Ethanol jeweils in Doppelbestimmung Standardproben zu je 2 ml Gesamtvolumen mit 0 Vol.-%, 9,9 Vol.-%, 19,8 Vol.-%, 29,7 Vol.-%, 39,6 Vol.-%, 49,5 Vol.-%, 59,4 Vol.-%, 69,3 Vol.-%, 79,2 Vol.-%, 89,1 Vol.-% und 99 Vol.-% Ethanol hergestellt, davon je 15 μl auf

den ATR-Kristall pipettiert und sofort eine Messung durchgeführt. Die erhaltenen Spektren werden mittels der Software QuantIR unter Nutzung des gesamten Spektralbereichs zwischen 800 cm^{-1} und 1800 cm^{-1} einer Kalibrierung zugeführt, für welche mittels *leave-one-out*-Validierung eine Abweichung von $\pm 1,76\%$ über den gesamten Kalibrierbereich resultiert. Die Bestimmung des Ethanolgehaltes erfolgt anschließend unter Nutzung dieser Kalibrierung ebenfalls über die Software QuantIR.

3.5 Statische Fluoreszenzspektroskopie an GHRH-Analoga

3.5.1 Geräteparameter

Die Parameter zur Messung der intrinsischen Fluoreszenzspektren an Proben des GHRH-Analogons sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle 6: Parameter der statischen Fluoreszenzspektroskopie an Proben des GHRH-Analogons

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
Photomultiplier-Spannung (PMV)	700 V	Anregungswellenlänge für Emissionsspektren	270 nm
Anregungsspaltbreite	5 nm	Wellenlängenbereich für Emissionsspektren	280 - 400 nm
Emissionsspaltbreite	5 nm	Emissionswellenlänge für Anregungsspektren	300 nm
Scan-Geschwindigkeit	60 nm/min	Wellenlängenbereich für Anregungsspektren	200 - 290 nm
Verwendete Küvette	Quarzglas, 10 x 2 mm, Hellma	Messtemperatur	20 °C

3.5.2 Durchführung der Messungen

Aus lyophilisiertem GHRH-Analogon-Acetat, welches durch Peptidsyntheseverfahren 2 hergestellt wurde, werden zunächst 3 verschiedene Stammlösungen angesetzt. In allen Fällen wird die notwendige Einwaage an lyophilisiertem Peptid zunächst mit demjenigen Volumen an DMSO versetzt, das erforderlich ist, um in der finalen Stammlösung einen DMSO-Gehalt von 0,1 Vol.-% zu erhalten. Diese Suspension wird im ersten Fall zunächst mit derjenigen Menge an Propylenglykol versetzt, welche gebraucht wird, um einen Gehalt von 10 Vol.-% in der Stammlösung zu erhalten, und anschließend mit Reinstwasser so verdünnt, dass eine effektive Peptidkonzentration von $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ resultiert. Im zweiten Fall wird die Peptidsuspension in DMSO ohne Propylenglykol-Zusatz direkt mit Reinstwasser so verdünnt, dass ein effektiver Peptidgehalt von $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ erhalten wird, und für die dritte Stammlösung

wird die Peptidsuspension in DMSO mit 0,9 %iger wässriger Natriumchlorid-Lösung entsprechend verdünnt, damit ein Peptidgehalt von 100 µg/ml erreicht wird.

Für die Stammlösungen 1 und 2, welche kein Natriumchlorid enthalten, werden jeweils in Doppelansätzen Konzentrationsstandards mit Peptidgehalten zwischen 1 µg/ml und 800 µg/ml in der Form angesetzt, dass für den Konzentrationsbereich zwischen 1 µg/ml und 20 µg/ml Proben im Abstand von je 1 µg/ml hergestellt werden, für den Konzentrationsbereich zwischen 20 µg/ml und 100 µg/ml im Abstand von je 10 µg/ml und für den höchsten Konzentrationsbereich zwischen 200 µg/ml und 800 µg/ml im Abstand von je 200 µg/ml. Für die Natriumchlorid-haltige Stammlösung 3 werden lediglich Konzentrationsstandards mit Peptidgehalten von 5 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml und 200 µg/ml generiert. Die Verdünnung erfolgt dabei in allen Fällen mit einem Solvensgemisch, welches die gleiche Zusammensetzung aus DMSO, Propylenglykol bzw. Natriumchlorid und Reinstwasser aufweist, wie die korrespondierende Peptid-Stammlösung.

Zwecks Untersuchung des Anregungs- und Emissionsspektrums des GHRH-Analogons wird die aus der Propylenglykol- und Natriumchlorid-freien Stammlösung 2 angesetzte Probe mit einem Peptidgehalt von 70 µg/ml verwendet.

Desweiteren werden vergleichende Messungen zum pH-abhängigen Fluoreszenzverhalten des GHRH-Analogons und von Tyrosinlösungen angestellt. Dazu wird zunächst jeweils eine Stammlösung von Tyrosin und dem GHRH-Analogen angesetzt, indem der jeweilige Feststoff zunächst mit derjenigen Menge an DMSO versetzt wird, die notwendig ist, um in der finalen Stammlösung einen DMSO-Gehalt von 0,2 Vol.-% zu erreichen, und anschließend mit verdünnter HCl-Lösung (pH 3,0) so verdünnt, dass eine Tyrosinkonzentration bzw. für das GHRH-Analogen eine Tyrosolgruppen-Konzentration von 50,8 µmol/l resultiert. Diese Stammlösungen werden jeweils in 8 Aliquote zu je 500 µl aufgeteilt und für beide Verbindungen je ein Aliquot durch Zugabe von verdünnter Ammoniaklösung auf pH 3,0, pH 4,0, pH 5,0, pH 6,0, pH 7,0, pH 8,0, pH 9,0 und pH 10,0 eingestellt und anschließend auf je 1000 µl Gesamtvolumen mit Reinstwasser aufgefüllt. Der finale pH-Wert der verdünnten Proben wird ggf. mit einigen Mikrolitern verdünnter HCl-Lösung bzw. verdünnter Ammoniaklösung korrigiert.

Alle erzeugten Peptidlösungen werden vor der Messung zunächst 3 Tage zur Äquilibrierung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und unmittelbar vor der Messung für 20 min bei 20 °C im Wasserbad inkubiert.

Die resultierenden Messwerttabellen und die Anregungs- und Emissionsspektren des GHRH-Analogons können der Anhang-DVD unter "GHRH-Analogon/intrinsische Fluoreszenz" entnommen werden.

3.6 Untersuchungen zur Aggregation des GHRH-Analogons mithilfe struktursensitiver UV- bzw. Fluoreszenz-Sonden

3.6.1 Probenpräparation

Die struktursensitiven Sonden Thioflavin T, ANS und Kongorot werden in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung des amyloiden Aggregationszustandes des GHRH-Analogons in Gegenwart verschiedener Lösungszusätze bzw. potentieller Aggregationsinhibitoren eingesetzt.

Tabelle 7: Ansatzbedingungen für den ersten Schritt der Untersuchung von Proben des GHRH-Analogons mithilfe struktursensitiver UV- bzw. Fluoreszenz-Sonden

Zusatzstoff	effektive Konzentration des Zusatzstoffes	pH-Wert im ersten Schritt der Präparation	untersuchte GHRH-Analogon-Salze
DMSO	0,1 %	7,0	Acetat
DMSO + Propylenglykol	0,1 % DMSO 10 % Propylenglykol	7,0	Acetat
DMSO + Propylenglykol	0,1 % DMSO 10 % Propylenglykol	4,0 (eingestellt mit HCl-Lsg.)	Acetat, Trifluoracetat, Hydrochlorid
Bernsteinsäure	10 mM	4,5	Acetat
Bernsteinsäure	20 mM	4,5	Acetat
L-Ascorbinsäure	10 mM	4,5	Acetat
L-Ascorbinsäure	20 mM	4,5	Acetat
D/L-Weinsäure	10 mM	4,5	Acetat
D/L-Weinsäure	20 mM	4,5	Acetat
Zitronensäure	10 mM	4,5	Acetat
Gluconsäure	10 mM	4,5	Acetat
Gluconsäure	25 mM	4,5	Acetat
Gluconsäure	5 %	4,5	Acetat
Benzylalkohol	1 %	4,5 (eingestellt mit NH ₄ OAc-Lsg.)	Acetat
Embonsäure + Benzylalkohol	100 µM Embonsäure + 1 % Benzylalkohol	4,5 (eingestellt mit NH ₄ OAc-Lsg.)	Acetat
Mannit	5 %	4,0 (eingestellt mit HCl-Lsg.)	Acetat, Trifluoracetat, Hydrochlorid
Bernsteinsäure + Mannit	10 mM Bernsteinsäure + 5 % Mannit	4,0	Acetat, Trifluoracetat, Hydrochlorid
Ammoniumacetat	0,1 M	4,5	Acetat, Trifluoracetat, Hydrochlorid
Ammoniumchlorid	0,1 M	4,5	Acetat, Trifluoracetat, Hydrochlorid

Dafür sind jeweils 2 Schritte bei unterschiedlichen pH-Wert-Bedingungen von Nöten. Im ersten Schritt sind in Vierfachansätzen jeweils in 900 µl Gesamtvolumen Lösungen des

GHRH-Analogs in Gegenwart des zu untersuchenden Zusatzstoffes bei pH 4,0, pH 4,5 oder pH 7,0 derart anzusetzen, dass in der finalen Probe nach dem folgenden 2. Schritt in 1000 µl Gesamtvolumen Peptidkonzentrationen von 5 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml bzw. 200 µg/ml resultieren. Die konkret für diesen ersten Schritt realisierten Ansatzbedingungen sind in Tabelle 7 dargestellt.

Jeweils 2 äquivalente Proben der hergestellten Vierfachansätze werden unter den in Tabelle 7 dargestellten Konditionen für 1 h bei RT inkubiert und anschließend im 2. Schritt der Präparation durch Zugabe von 100 µl verdünnter Ammoniaklösung, welche 9 % Natriumchlorid enthält, auf pH 7,0 eingestellt. Die verbleibenden 2 Proben eines jeden Vierfachansatzes werden für 3 Tage bei 4 °C inkubiert und anschließend auf RT temperiert, bevor in analoger Weise pH-Wert und Natriumchloridgehalt angepasst werden. Für jede Probe wird dabei in einer analogen Blindprobe ohne Peptid die notwendige Ammoniakmenge zuvor titriert, die notwendig ist, um einen pH-Wert von 7,0 zu gewährleisten.

Ausnahmen zum dargestellten Verfahren stellen lediglich die ersten beiden Proben aus Tabelle 7 dar, welche bereits nach dem ersten Schritt bei pH 7,0 vorliegen. Für die erste Probe werden zwei verschiedene Varianten untersucht. Zum einen wird die Probe im 2. Schritt lediglich mit 0,1 %iger DMSO-Lösung auf 1000 µl aufgefüllt, zum anderen wird mit einer 0,1 %igen DMSO-Lösung, welche zusätzlich 9 % Natriumchlorid enthält aufgefüllt. Die zweite, Propylenglykol-enhaltende Probe wird im zweiten Schritt mit 100 µl einer Lösung versetzt, die 0,1 % DMSO, 10 % Propylenglykol und 9 % Natriumchlorid enthält.

3.6.2 Untersuchungen zur Peptidaggregation mit der Fluoreszenz-Sonde Thioflavin T (ThioT)

Die Proben werden nach der Neutralisierung und der Anpassung des Natriumchlorid-Gehaltes für 1 h im Wasserbad bei 20 °C inkubiert, jeweils mit 30 µl einer Thioflavin T-Stammlösung von 40 µmol/l in Reinstwasser versetzt, gut durchmischt und für weitere 20 min bei 20 °C inkubiert, bevor die Fluoreszenzmessungen durchgeführt werden. Bei einer Anregungswellenlänge von 450 nm sind Emissionsspektren zwischen 465 und 565 nm aufzunehmen. Die verwendeten Parameter des Fluoreszenzspektrometers entsprechen den in Tabelle 6 dargestellten Werten mit Ausnahme der Photomultiplier-Spannung, welche auf 950 V eingestellt wird. In Fällen, in denen die gemessene Fluoreszenzintensität den erfassbaren Bereich bei der genannten Spannung übersteigt, wird die gesamte Messreihe bei 700 V wiederholt und auf Basis der bei beiden Einstellungen erfassbaren Proben ein

Korrekturfaktor ermittelt, mit dessen Hilfe die Werte der zu stark fluoreszierenden Proben von den Messwerten bei 700 V auf 950 V aufskaliert werden. Auf diese Weise wird die Einführung verschiedener Skalen vermieden.

Die erhaltenen Messreihen stehen auf der Anhang-DVD unter "GHRH-Analogon/Sondenbindungsuntersuchungen" zur Verfügung.

3.6.3 Untersuchungen zur Peptidaggregation mithilfe der struktursensitiven Sonde 8-Anilinonaphthalin-1-sulfonsäure (ANS)

Die Proben werden nach erfolgter Neutralisierung und Korrektur des Natriumchloridgehaltes für 1 h bei 20 °C im Wasserbad inkubiert, anschließend mit 25 µl einer ANS-Stammlösung mit einer Konzentration von 0,2 mmol/l versetzt, gut durchmischt und für weitere 20 min bei 20 °C im Wasserbad inkubiert. Fluoreszenzspektroskopisch werden Emissionsspektren im Wellenlängenbereich von 400 - 650 nm bei einer Anregungswellenlänge von 346 nm aufgenommen. Die verwendeten Parameter für die Fluoreszenzspektroskopie stimmen mit den in Tabelle 6 angeführten Werten überein, mit Ausnahme der Photomultiplier-Spannung, welche standardmäßig auf 950 V eingestellt wird. In Fällen, in denen die gemessene Fluoreszenzintensität bei dieser Spannungsvorgabe den erfassbaren Bereich übersteigt, wird die gesamte Messreihe bei 700 V wiederholt und auf Basis der bei beiden Einstellungen erfassbaren Proben ein Korrekturfaktor ermittelt, mit dessen Hilfe die Werte der zu stark fluoreszierenden Proben von den Messwerten bei 700 V auf 950 V aufskaliert werden. Auf diese Weise wird die Einführung verschiedener Skalen vermieden.

Die ermittelten Messreihen können der Anhang-DVD unter "GHRH-Analogon/Sondenbindungsuntersuchungen" entnommen werden.

3.6.4 Untersuchungen zur Peptidaggregation mithilfe der struktursensitiven Sonde Kongorot (CR)

Nach Neutralisation und Anpassung des Natriumchloridgehaltes werden die Proben für 1 h bei 20 °C im Wasserbad inkubiert, danach mit 20 µl einer frisch bereiteten Kongorot-Lösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml in Reinstwasser versetzt, gut durchmischt und weitere 20 min bei 20 °C inkubiert. Die anschließende Messung der Proben erfolgt UV/VIS-spektroskopisch mit den in Tabelle 8 aufgeführten Parametern. Es werden jeweils die

Extinktionswerte bei 497 nm und 538 nm bestimmt und daraus der Quotient $(E(497\text{nm}) - E(538\text{nm}))/E(538\text{nm})$ berechnet.

Tabelle 8: Parameter der UV/VIS-spektroskopischen Untersuchungen von GHRH-Analagon-Lösungen in Gegenwart der struktursensitiven Sonde Kongorot

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
Strahlengang	Einstrahlgerät	Auflösung	0,85 nm
Küvette	Quarzglas, 4 x 10 mm	Modus	Extinktion
Integrationszeit	104,0 ms	Zyklusart	Einfach
Akkumulation	5	Wellenlängenbereich	200 - 800 nm

Die ermittelten Messreihen können von der Anhang-DVD unter "GHRH-Analagon/Sondenbindungsuntersuchungen" abgerufen werden.

3.7 Kongorottitration von GnRH-Antagonisten

3.7.1 Untersuchungen zur Kongorotbindungskapazität von GnRH-Antagonisten

Es sind jeweils Stammlösungen der GnRH-Antagonisten Cetrorelix, Ozarelix und Teverelix, sowie zum Vergleich eine Stammlösung des Proteins Ovalbumin mit einer einheitlichen effektiven Peptidkonzentration von 0,3 mg/ml in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) herzustellen. Für jedes Peptid bzw. Protein werden durch entsprechende Verdünnung mit 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) in Doppelansätzen Proben mit Peptidgehalten von jeweils 0,3 mg, 0,6 mg und 0,9 mg in je 4 ml Gesamtvolumen in Zentrifugenröhrchen angesetzt und für 20 min bei RT gerührt. Anschließend werden die Proben durch Zugabe einer in jedem Fall zuvor anhand einer peptidfreien Referenz zu titrierenden Menge an verdünnter Ammoniaklösung auf pH 7,0 eingestellt und für weitere 30 min bei RT gerührt.

Die Kongorottitration erfolgt diskontinuierlich. In jedem Schritt werden der Probe 50 µl einer frisch bereiteten Kongorotlösung zu 1 mg/ml in Reinstwasser zugegeben, wodurch im Anfangsstadium der Untersuchung eine Fällung induziert wird. Die Suspension wird für 20 min bei RT gerührt und danach bei 4000 rpm zentrifugiert. Dem Überstand werden 100 µl für die UV/vis-spektroskopische Bestimmung der in Lösung befindlichen Kongorotmenge entnommen und durch Zugabe von 900 µl Reinstwasser 1/10 (v/v) verdünnt. Die für die UV/vis-Spektroskopie herangezogenen Parameter entsprechen den in Tabelle 8 dargestellten Werten. Für die Bestimmung der in Lösung befindlichen Kongorotmenge wird die Extinktion bei 497 nm verwendet.

Niederschlag und Überstand der verbliebenen Probe werden für den folgenden Titrationsschritt durch starkes Rühren wieder zu einer Suspension vermischt und anschließend werden die Proben mit 50 µl Kongorot und zur Volumenkorrektur zusätzlich mit 50 µl Reinstwasser versetzt. Die Titration wird über 14 Schritte geführt, womit insgesamt 700 µl Kongorotlösung zugesetzt werden.

Die erhaltenen Messwerttabellen sind auf der beiliegenden Anhang-DVD unter "Kongorottitration/Bindungskapazität_von_GnRH-Antagonisten" abgelegt.

3.7.2 Kongorottitration in Gegenwart von potentiellen Inhibitoren der amyloiden Aggregation von GnRH-Antagonisten

Für die standardisierte Untersuchung des Amyloidgehaltes von GnRH-Antagonisten in Gegenwart verschiedener, potentieller Aggregationsinhibitoren wurde das Verfahren der Kongorottitration mehrfach mit dem Ziel optimiert, die notwendige GnRH-Antagonisten-Menge für die Bestimmung so weit wie möglich zu reduzieren bei gleichzeitiger Beibehaltung von Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Methode. Als finales Protokoll wird das in der Bachelorarbeit von C. Grundmann etablierte Vorgehen verwendet [Grundmann, 2014].

Bei diesem Vorgehen werden Stammlösungen der GnRH-Antagonisten mit 0,22 mg/ml effektiver Peptidkonzentration in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) und Stammlösungen des potentiellen Aggregationsinhibitors zu 0,75 mg/ml bzw. im Falle von Tanninfraktionen oder -spezies zu 0,75 mg GAE/ml in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) hergestellt. Dabei werden die Lösungen der Tanninfraktionen bzw. -spezies nach ihrer jeweiligen Isolierung gemäß Abschnitt 3.12 oder 3.13 am Rotationsverdampfer von organischen Lösungsmittelresten befreit, anschließend gemäß Abschnitt 3.11 deren Phenolgehalt bestimmt, die zur Herstellung der entsprechenden Stammlösung notwendige Menge in ein separates Gefäß überführt, mit Reinstwasser so aufgefüllt, dass eine finale Tanninkonzentration von 0,75 mg GAE/ml resultiert, und schließlich durch Eisessig-Zugabe ein pH-Wert von 3,0 eingestellt. Alle Tanninstammlösungen sind zur Vermeidung von Hydrolyseerscheinungen jeweils am Tag der Kongorottitration frisch herzustellen.

Für jeden zu testenden, potentiellen Aggregationsinhibitor sind jeweils in Doppelbestimmung Proben mit vier unterschiedlichen Inhibitor/GnRH-Antagonist-Massenverhältnissen zu untersuchen. Dafür werden in Zentrifugenröhrchen zu je 2 ml der entsprechenden GnRH-Antagonisten-Stammlösung 880 µl der Inhibitor-Stammlösung zum Erreichen eines Massenverhältnisses von 3:1, 295 µl für ein Massenverhältnis von 1:1, 148 µl für ein

Massenverhältnis von 0,5:1 und 60 µl für ein Massenverhältnis von 0,2:1 zugesetzt und schließlich mit 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) auf 4 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Proben werden analog zu dem in Abschnitt 3.7.1 beschriebenen Vorgehen zunächst für 20 min bei RT gerührt, dann durch Zugabe einer vorher mittels Titration peptidfreier Referenzlösungen bestimmten Menge an Ammoniaklösung neutralisiert und vor Beginn der diskontinuierlichen Titration erneut für 30 min bei RT gerührt.

Titration und Probennahme erfolgen identisch zu dem oben beschriebenen Verfahren, jedoch wird in diesem Fall eine Kongorot-Stammlösung mit einer Konzentration von nur 0,25 mg/ml in Reinstwasser eingesetzt. Nach diesem standardisierten Verfahren werden alle Untersuchungen in Gegenwart von Tanninfraktionen und -spezies als potentielle Aggregationsinhibitoren durchgeführt.

Darüber hinaus erfolgen Untersuchungen zum Amyloidgehalt von Systemen aus Cetorelix, der ungetrennten Gallotanninmischung und Poly-L-Glutamat unter teilweise abweichenden Bedingungen.

Da Poly-L-Glutamat bei pH 3,0 nicht hinreichend löslich ist, werden für die Untersuchung des Einflusses verschiedener Poly-L-Glutamat/Cetorelix-Massenverhältnisse zunächst 2 ml einer Cetorelix-Stammlösung in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) mit Konzentrationen von 0,45 mg/ml bzw. 0,556 mg/ml vorgelegt und mit verdünnter Ammoniaklösung neutralisiert. Anschließend werden entsprechende Volumina an einer Poly-L-Glutamat-Stammlösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml in wässriger 0,1 M Ammoniumacetat-Lösung (pH 7,0) so zugegeben, dass Poly-L-Glutamat/Cetorelix-Massenverhältnisse von 0,045:1, 0,090:1, 0,100:1, 0,450:1, 0,900:1 und 1,800:1 resultieren. Die Titration erfolgt analog zu den beschriebenen Verfahren in 50 µl-Schritten mit einer Kongorot-Stammlösung von 1 mg/ml in Reinstwasser.

Zwecks Untersuchung des Einflusses der Präparationsbedingungen auf den Amyloidgehalt von Systemen aus Cetorelix, der ungetrennten Gallotanninmischung und Poly-L-Glutamat werden Stammlösungen für Cetorelix mit exakten Einwaagen im Konzentrationsbereich zwischen 0,375 mg/ml und 0,556 mg/ml in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) hergestellt, für die Gallotanninmischung bei einer Konzentration von 3 mg/ml ebenfalls in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) und für Poly-L-Glutamat bei einer Konzentration von 2 mg/ml in 0,1 M Ammoniumacetat-Lösung (pH 7,0). Im ersten Experiment werden 2 ml der Cetorelix-Stammlösung mit demjenigen Volumen an Tannin-Stammlösung bei pH 3,0 versetzt, dass ein Tannin/Cetorelix-Massenverhältnis von 3:1 realisiert wird. Der Ansatz wird mit 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) auf 4 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und nach 20-minütigem Rühren bei

RT mit verdünnter Ammoniaklösung auf pH 7,0 eingestellt, bevor mit der Titration begonnen wird. Im zweiten Experiment werden die gleichen Mengen an Cetorelix- und Tannin-Stammlösung wie im ersten Experiment verwendet. Jedoch werden diese zunächst separat voneinander durch Zugabe von zuvor mittels Titration bestimmter Volumina an verdünnter Ammoniaklösung neutralisiert. Nach 20 min erfolgt die Mischung beider Lösungen und das Auffüllen mit 0,1 M Ammoniumacetat-Lösung (pH 7,0) auf 4 ml Gesamtvolumen, bevor die Titration erfolgt. Im dritten Experiment sind 750 µl der Tannin-Stammlösung zunächst mit verdünnter Ammoniaklösung zu neutralisieren und anschließend darin effektiv 0,75 mg Cetorelix zu lösen, wobei der Peptidgehalt des lyophilisierten Cetorelix-Acetates zu berücksichtigen ist. Die Lösung, in welcher auf diese Weise ein Tannin/Cetorelix-Massenverhältnis von 3:1 erzielt wird, wird auf 4 ml Gesamtvolumen mit 0,1 M Ammoniumacetat-Lösung verdünnt und für die Titration verwendet. Im vierten Experiment wird zunächst analog zum ersten Experiment bei pH 3,0 eine Mischung aus 2 ml Cetorelix-Stammlösung und einem korrespondierenden Volumen an Tannin-Stammlösung eine Mischung mit einem Tannin/Cetorelix-Massenverhältnis von 3:1 erzeugt und mit verdünnter Ammoniaklösung neutralisiert. Zu dieser neutralisierten Lösung wird in der Folge jedoch zunächst so viel Poly-L-Glutamat-Stammlösung zugegeben, dass ein Massenverhältnis Tannin/Cetorelix/Poly-L-Glutamat von 3:1:2 entsteht, und erst danach auf 4 ml Gesamtvolumen mit 0,1 M Ammoniumacetat-Lösung aufgefüllt.

Die Kongorottitration erfolgt in diesen Fällen stets in 50 µl-Schritten mit einer Kongorot-Lösung zu 1 mg/ml in Reinstwasser.

Die Messwerttabellen samt ggf. zu spezifizierender, eingesetzter Cetorelix-Menge sind der Anhang-DVD unter "Kongorottitration" zu entnehmen.

3.8 Untersuchung des Phasenverhaltens von GnRH-Antagonisten

3.8.1 Ermittlung von Aggregationsphasendiagrammen von Cetorelix und Ozarelix in binären Solvensgemischen aus Wasser und Ethanol bzw. aus Wasser und DMSO

In verschraubbaren Glas-Küvettenröhrchen mit einem runden Querschnitt ($d = 10 \text{ mm}$) werden aus Reinstwasser und 99 %igem vergällten Ethanol in je 1,8 ml Probenvolumen mehrere Ethanol/Wassergemische hergestellt. Zu jeder Probe werden 200 µl einer Cetorelix- bzw. einer Ozarelix-Stammlösung mit einem effektiven Peptidgehalt von 10 mg/ml in

3 Material und Methoden

50 %igem Ethanol hinzu pipettiert, sodass in den Proben eine effektive Peptidkonzentration von 1 mg/ml entsteht. Für Cetrorelix wird darüber hinaus für eine kleine Auswahl an Ethanol/Wasser-Gemischen eine Probenserie mit einem effektiven Peptidgehalt von 10 mg/ml hergestellt, indem jeweils 20 mg effektive Peptideinwaage in 2 ml des entsprechenden Ethanol/Wasser-Gemisches gelöst werden. Anschließend wird jeweils gut durchmischt, das Küvettenröhrchen fest verschlossen und für 60 min im siedenden Wasserbad inkubiert, um homogene Ausgangslösungen zu schaffen. Nach Abkühlen der Proben auf RT sind jeweils 15 µl zu entnehmen und daraus mittels ATR-FTIR-Spektroskopie gemäß Abschnitt 3.4.6 der exakte Ethanolgehalt der Mischungen zu bestimmen. Danach wird jede Probe mit 50 µl einer Kongorotlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml in Reinstwasser versetzt und wiederum fest verschlossen im siedenden Wasserbad für 30 min äquilibriert.

Nach dieser Zeit wird jede Probe einzeln aus dem Wasserbad entnommen, mit Zellstoff von anhaftendem Wasser befreit und sofort am UV/VIS-Spektrometer nach den in Tabelle 8 aufgeführten Bedingungen gemessen. Die Extinktionswerte bei 497 nm und 538 nm werden bestimmt und daraus der Quotient $(E(497\text{nm})-E(538\text{nm}))/E(538\text{nm})$ berechnet. Im Anschluss werden die Küvetten wieder in das Wasserbad gesetzt, die nächste zu erfassende Temperatur eingestellt und nach Erreichen dieser Temperatur wiederum für 30 min äquilibriert, bevor die nächste UV/vis-spektroskopische Messung erfolgt. Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die Parameter der durchgeführten Messreihen.

Tabelle 9: Übersicht über die Parameter der Messreihen zur Erfassung von Aggregations-Phasendiagrammen von Cetrorelix und Ozarelix in Ethanol/Wasser-Gemischen

GnRH-Antagonist	Cetrorelix	Cetrorelix	Ozarelix
effektive Peptidkonzentration	1 mg/ml	10 mg/ml	1 mg/ml
ATR-FTIR-spektroskopisch bestimmte Ethanol-Massenanteil der untersuchten Mischungen	w = 0,00 % w = 9,54 % w = 17,73 % w = 23,89 % w = 35,63 % w = 46,74 % w = 52,30 % w = 63,40 % w = 73,07 % w = 86,43 %	w = 14,48 % w = 19,32 % w = 23,65 % w = 34,53 % w = 48,28 % w = 52,05 %	w = 0,00 % w = 5,16 % w = 9,89 % w = 14,85 % w = 20,14 % w = 25,13 % w = 30,05 % w = 39,78 %
untersuchte Temperaturen	15 °C 30 °C 40 °C 50 °C 65 °C 80 °C 90 °C 100 °C	10 °C 30 °C 40 °C 50 °C 60 °C 70 °C 80 °C 90 °C 100 °C	25 °C 35 °C 44 °C 57 °C 70 °C 100 °C

Weiterhin wird durch Lösen von je 20 mg Cetrorelix in 2 ml bestimmter Ethanol/Wasser-Gemische eine Probenserie generiert, welche analog zu dem oben beschriebenen Verfahren, jedoch ohne Kongorot-Zugabe in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht werden. In diesem Fall wird bei langsamem Absenken der Temperatur (10 K/h) durch Beobachten der Proben durch gekreuzte, lineare Polarisationsfilter der Klärpunkt der Proben anhand der auftretenden Doppelbrechung bei Unterschreiten dieses Punktes ermittelt. Für jede Probe wird der Klärpunkt verifiziert, indem das Auftreten bzw. das Verschwinden der Doppelbrechung bei Überschreiten der Klärpunktes mehrfach wiederholt wird.

In Vorbereitung auf NMR-spektroskopische Untersuchungen wird zudem das Aggregationsphasenverhalten in DMSO/Wasser-Gemischen untersucht. Hierfür werden in den gleichen Küvettenröhrchen Proben mit einem verringerten Gesamtvolumen von lediglich 400 µl mit einem effektiven Peptidgehalt von 10 mg/ml in verschiedenen DMSO/Wasser-Gemischen mit DMSO-Gehalten zwischen 10 Vol.-% und 100 Vol.-% in 10 Vol.-%-Schritten angesetzt, zunächst für 60 min im siedenden Wasserbad äquilibriert und nach Abkühlung auf RT durch gekreuzte, lineare Polarisationsfilter betrachtet, um das Auftreten von Doppelbrechung erfassen zu können.

Die erhaltenen Messwerttabellen und Phasendiagramme sind auf der Anhang-DVD unter "Phasenverhalten_von_GnRH-Antagonisten" zu finden.

3.8.2 Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie (TCSPC) an Teverelix-Lösungen

Aus lyophilisiertem Teverelix-Acetat ist unter Beachtung des effektiven Peptidgehaltes eine Stammlösung mit einer Peptidkonzentration von 0,300 mg/ml in 10 mM Ammoniumacetat-Lösung (pH 7,0) herzustellen und für 24 h unter Rühren bei RT zu inkubieren. Anschließend wird durch Verdünnen mit 10 mM Ammoniumacetat-Lösung (pH 7,0) in Doppelansätzen eine Konzentrationsreihe zu je 2 ml Probenvolumen mit Teverelix-Konzentrationen zwischen 0,0005 mg/ml und 0,3000 mg/ml erstellt. Die verdünnten Proben werden in Eppendorf-Gefäßen zunächst für 4 h geschüttelt und anschließend für 7 Tage unter Lichtausschluss bei RT inkubiert. In analoger Weise werden 5 identische Proben mit einer Teverelix-Konzentration von 0,1 mg/ml in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) hergestellt.

Die Messung der TCSPC-Histogramme erfolgt jeweils in verschließbaren Quarzküvetten nach 2-minütigem Spülen mit Argon zur Entfernung des in der Lösung enthaltenen Sauerstoffs. Die verwendeten Parameter der Messung sind Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Parameter der TCSPC-Untersuchungen an Teverelix-Lösungen in 10 mM Ammoniumacetat-Lösung (pH 7,0) und 0,1 M Essigsäure (pH 3,0)

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
Küvette	Quarzküvette, 10 x 10 mm, Hellma	Time-to-Amplitude converter range	200 ns (Kalibrierung: 1024 Kanäle → 230,315 ns)
Anregungswellenlänge	284 nm	Coaxial delay	5 ns
Emissionswellenlänge	332 nm	Sync delay	10 ns
Excitation Focus	100 %	Repetition rate	1 MHz
Emission 1 Focus	60 %	Peak preset	2000 counts
Bandbreite	2 nm	Prompt	LUDOX TM-50 colloidal silica, w = 5 % in Wasser

Die gemessenen TCSPC-Histogramme werden mithilfe der Software DAS6 iterativ durch eine Summe aus drei Exponentialfunktionen der in Gl. 5 dargestellten Form beschrieben.

$$I(t) = I_0 \cdot \sum_i B_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (\text{Gl. 5})$$

mit B_i präexponentieller Faktor des Relaxationsprozesses i
 τ_i Fluoreszenzlebensdauer des Relaxationsprozesses i

Die ermittelten präexponentiellen Faktoren B_i können der Anhang-DVD unter "Phasenverhalten_von_GnRH-Antagonisten/TCSPC_Teverelix" entnommen werden.

3.8.3 Doppelbrechungsuntersuchungen an Teverelix-Lösungen

Durch Lösen einer entsprechenden Menge an Teverelix-Acetat in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) werden in 10 ml-Rollrandschnappdeckelgläschen in je 2 ml Probenvolumen Lösungen mit einem effektiven Peptidgehalt von 1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml, 6 mg/ml, 8 mg/ml und 10 mg/ml generiert. Diese Proben werden für 24 h bei RT gerührt und anschließend durch gekreuzte, lineare Polarisationsfilter betrachtet und fotografiert, um auftretende Doppelbrechungserscheinungen zu dokumentieren.

3.8.4 Kristallisationsversuche von Cetorelix-Aggregaten

3.8.4.1 pH-induzierte Kristallisation

Die Aggregation von Cetorelix lässt sich durch eine pH-Erhöhung von pH 2,5 auf pH-Werte über 3,0 induzieren. Hierfür wird in Anlehnung an die vorgelagerte Masterarbeit [Beil, 2012(1)] in 2 ml einer 1 %igen Cetorelix-Lösung in verdünnter Essigsäure (pH 2,5) über eine

Kapillare langsam Ammoniak-Gas zugeführt. Dazu wird die essigsäure Cetorelix-Lösung zunächst für 24 h bei RT gerührt, mit Parafilm verschlossen und ohne Rühren über eine Schlauchkonstruktion mit einer Spritzenkanüle Ammoniak aus einem benachbarten Gefäß mit konzentrierter Ammoniak-Lösung zugeführt. Nach 6 h wird an der Oberfläche der Cetorelix-Lösung einsetzende Doppelbrechung beobachtet, die nach 3 Tagen das gesamte Probenvolumen erfasst und die abgeschlossene Erstarrung indiziert. Das entstandene Gel wird durch vorsichtiges Schwenken in 2 ml Reinstwasser von der Wandung gelöst und über Phosphorpentoxid im Exsikkator für 7 Tage getrocknet. Es resultieren spröde, doppelbrechende Plättchen.

3.8.4.2 Temperatur-induzierte Kristallisation

In Ethanol/Wasser-Gemischen werden Charakteristika der Aggregation von Cetorelix in Abhängigkeit von Lösungsmittelzusammensetzung und Temperatur, wie in Abschnitt 3.8.1 beschrieben, erfasst. Für Kristallisationsversuche werden Cetorelix-Proben mit je 10 mg/ml effektiver Peptidkonzentration einerseits in einer Ethanol/Wasser-Mischung mit 18,4 Vol.-% Ethanol und zum anderen in einer solchen Mischung mit 30,0 Vol.-% Ethanol angesetzt, für 60 min im siedenden Wasserbad erhitzt und anschließend langsam um 10 K/h auf Raumtemperatur abgekühlt, wobei sich in beiden Fällen eine doppelbrechende Mesophase ausbildet. Die polarisationsmikroskopische Untersuchung beider Proben erfolgt nach 14-tägiger, erschütterungsfreier Inkubation bei RT. Für die Untersuchung werden separate, lineare Polarisationsfilter zum einen zwischen Lichtquelle und Probenträger des Mikroskops und zum anderen zwischen Probe und Objektiv gebracht. Desweiteren wird für eine Probe unter dem Mikroskop durch Zugabe eines Tropfens einer Kongorot-Lösung zu 1 mg/ml in Reinstwasser auf amyloide Strukturen getestet.

3.9 TEM- und Kryo-TEM-Untersuchungen an GHRH-Analoga

3.9.1 Probenpräparation

Es werden 3 Proben des GHRH-Analogons in Gesamtvolumina von je 3 ml mit einer jeweiligen effektiven Peptidkonzentration von 3 mg/ml hergestellt.

Für die erste Probe wird die notwendige Menge an lyophilisiertem GHRH-Analogon-Acetat, welches nach Peptidsyntheseverfahren 2 hergestellt wurde, in 180 µl einer verdünnten HCl-Lösung (pH 4,5) gelöst und für 24 h bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wird

die Probe durch Zugabe von 20 µl einer verdünnten Ammoniaklösung auf pH 7,0 eingestellt. Die Konzentration der notwendigen Ammoniaklösung wird anhand einer peptidfreien Referenz durch Titration bestimmt. Die Probe wird gut durchmischt und für 2 h bei RT vor der Messung inkubiert.

Die zweite Probe wird aus dem gleichen GHRH-Analogon-Material durch Lösen in 180 µl einer 22,22 mM Ascorbinsäure-Lösung, welche durch Ammoniak-Zugabe auf pH 4,5 eingestellt wird, generiert. Nach 24-stündiger Inkubation bei 4 °C wird durch Zugabe von 20 µl einer 9 % Natriumchlorid enthaltenden, verdünnten Ammoniaklösung ein pH-Wert von 7,0 eingestellt und ebenfalls für 2 h bei RT vor Durchführung der Messung inkubiert.

Die dritte Probe wird durch Lösen des genannten GHRH-Analogon-Acetates in 180 µl einer Lösung, die 111,1 µM Embonsäure und 1,11 Vol.-% Benzylalkohol enthält und durch Ammoniak-Zugabe auf pH 4,5 eingestellt ist, gewonnen. Nach 24 h Inkubation bei 4 °C sind auch in diesem Fall 20 µl einer 9 %igen Natriumchlorid-Lösung in verdünntem Ammoniak zuzugeben, um pH 7,0 zu erreichen. Die Probe wird ebenfalls für 2 h bei RT gelagert.

Für alle Proben wird zusätzlich eine mit Reinstwasser 1:25 verdünnte Probe hergestellt.

3.9.2 Durchführung der Messungen

Die TEM- und Kryo-TEM-Messungen wurden für die vorliegende Arbeit dankenswerter Weise durch Herrn Dr. P. Formánek am Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V. durchgeführt.

Als Probenträger werden mit Kohlenstoffmembranen überzogene Kupfer-Netze eingesetzt. Nach Testung zweier verschiedener Träger (Kohlenstoffmembranen mit bzw. ohne Löcher) werden ausschließlich Messungen mit Trägern mit löcherenthaltenden Membranen ausgewertet. Die Kohlenstoffmembranen sind jeweils vor der Probenauftragung für 2 min einem Sauerstoffplasma auszusetzen, um eine hydrophile Oberfläche zu generieren. Anschließend werden jeweils 2 µl der Probelösung auf die prozessierte Membran aufgetragen und nach wenigen Minuten überschüssiges Lösungsmittel vorsichtig mit einem Filterpapier entfernt. Die getrocknete Probe wird über einen Probenträger in das Elektronenmikroskop eingebracht.

Für die dargestellten Kryo-TEM-Messungen werden ausschließlich die 1:25-verdünnten Proben nach erfolgter Neutralisation für eine Woche bei 4 °C inkubiert und anschließend jeweils ein hauchdünner Film unter Nutzung von flüssigem Ethan bei Flüssigstickstoff-Temperatur auf den prozessierten Träger aufgetragen, bevor die Messung erfolgt.

3.10 NMR-Untersuchungen zur 3D-Struktur der Peptide

3.10.1 Probenpräparation und Spektrenakkumulation

Für jede Probe werden 6 mg - 10 mg des lyophilisierten Peptides in 0,6 ml deuteriertem Solvens unter Rühren gelöst und anschließend in ein verschließbares NMR-Röhrchen überführt. Tabelle 11 gibt eine Übersicht der untersuchten Proben und der aufgenommenen NMR-Spektren. Die Messungen erfolgten dabei dankenswerter Weise durch Frau Dr. M. Gruner und Herrn Dr. T. Lübken an der Technischen Universität Dresden.

Tabelle 11: Übersicht untersuchter NMR-Proben und der jeweils aufgenommenen NMR-Spektren

Peptid	deuteriertes Lösungsmittel	aufgenommene NMR-Spektren
Cetrorelix-Acetat	DMSO-d ₆	¹ H-NMR, ¹³ C-NMR (DEPT), ¹ H/ ¹ H-COSY, ¹ H/ ¹ H-NOESY, ¹ H/ ¹ H-ROESY, ¹ H/ ¹³ C-HSQC, ¹ H/ ¹³ C-HMBC, ¹ H/ ¹⁵ N-HSQC, ¹ H-DOSY
Cetrorelix-Acetat	DMSO-d ₆ /D ₂ O (70/30 (v/v))	¹ H-NMR, ¹³ C-NMR (DEPT), ¹ H/ ¹ H-COSY, ¹ H/ ¹ H-NOESY, ¹ H/ ¹ H-ROESY, ¹ H/ ¹³ C-HSQC, ¹ H/ ¹³ C-HMBC, ¹ H-DOSY
Cetrorelix-Acetat	DMSO-d ₆ /D ₂ O (60/40 (v/v))	¹ H-NMR, ¹ H-DOSY
Cetrorelix-Acetat	DMSO-d ₆ /D ₂ O (45/55 (v/v))	¹ H-NMR, ¹³ C-NMR (DEPT), ¹ H/ ¹ H-COSY, ¹ H/ ¹ H-NOESY, ¹ H/ ¹ H-ROESY, ¹ H/ ¹³ C-HSQC, ¹ H/ ¹³ C-HMBC, ¹ H-DOSY
Ozarelix-Acetat (0562048)	DMSO-d ₆	¹ H-NMR, ¹ H/ ¹ H-COSY, ¹ H/ ¹ H-NOESY, ¹ H/ ¹ H-ROESY
Ozarelix-Acetat (0662048)	DMSO-d ₆	¹ H-NMR, ¹³ C-NMR (DEPT), ¹ H/ ¹ H-COSY, ¹ H/ ¹ H-NOESY, ¹ H/ ¹ H-ROESY, ¹ H/ ¹³ C-HSQC, ¹ H/ ¹³ C-HMBC, ¹ H/ ¹⁵ N-HSQC, ¹ H-DOSY
Teverelix-Acetat	DMSO-d ₆	¹ H-NMR, ¹³ C-NMR (DEPT), ¹ H/ ¹ H-COSY, ¹ H/ ¹ H-NOESY, ¹ H/ ¹ H-ROESY, ¹ H/ ¹³ C-HSQC, ¹ H/ ¹³ C-HMBC, ¹ H/ ¹⁵ N-HSQC, ¹ H-DOSY
Teverelix-Trifluoracetat	DMSO-d ₆	¹ H-NMR, ¹ H/ ¹ H-COSY, ¹ H/ ¹ H-NOESY, ¹ H/ ¹ H-ROESY,
GHRH-Analogon-Trifluoracetat (nach Peptidsyntheseverfahren 1)	DMSO-d ₆	¹ H-NMR, ¹³ C-NMR (DEPT), ¹ H/ ¹ H-COSY, ¹ H/ ¹ H-NOESY, ¹ H/ ¹ H-ROESY, ¹ H/ ¹³ C-HSQC, ¹ H/ ¹³ C-HMBC, ¹ H/ ¹⁵ N-HSQC, ¹ H-DOSY
GHRH-Analogon-Trifluoracetat (nach Peptidsyntheseverfahren 2)	DMSO-d ₆	¹ H-NMR, ¹³ C-NMR (DEPT), ¹ H/ ¹ H-COSY, ¹ H/ ¹ H-NOESY, ¹ H/ ¹ H-ROESY, ¹ H/ ¹³ C-HSQC, ¹ H/ ¹³ C-HMBC, ¹ H/ ¹⁵ N-HSQC, ¹ H-DOSY

Für alle in Tabelle 11 aufgeführten NMR-Spektren können die akkumulierten Rohdaten sowie die prozessierten NMR-Spektren der Anhang-DVD unter "NMR-Material/Rohdaten" bzw. "NMR-Material/Spektren" entnommen werden. Einzig für die GHRH-Analoga können keine solche Zusatzmaterialien zur Verfügung gestellt werden. Bei Interesse ist es erforderlich, sich mit Biscayne Pharmaceuticals in Verbindung zu setzen.

Pulsprogramme und weitere Details der Spektrenakkumulation werden hier nicht im einzelnen aufgelistet, sondern sind bei Interesse den auf der Anhang-DVD befindlichen Rohdaten zu entnehmen.

3.10.2 **Etablierung eines Software-Systems zur 3D-Strukturberechnung von GnRH- und GHRH-Analoga basierend auf *NOE-distance-restraints***

Die Berechnung der 3D-Strukturen von GnRH-Antagonisten und GHRH-Analoga unter Nutzung von *distance restraints*, welche aus $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY-Spektren bestimmt werden, basiert auf einem umfangreichen Softwaresystem, welches in Abb. 17 dargestellt ist.

Das zentrale Programmpaket *UNIO* wird für die vorliegende Arbeit von seinem Entwickler Dr. T. Herrmann zur Verfügung gestellt [Herrmann et al., 2002 (1); Herrmann et al., 2002 (2)]. Es vereint eine Reihe von Hochleistungs-Algorithmen zur Bestimmung von 3D-Strukturen von Biomolekülen, welche zu großen Teilen an der ETH Zürich unter Leitung von Prof. K. Wüthrich entwickelt wurden. Der für den vorliegenden Sachverhalt zentrale Algorithmus *ATNOS/CANDID* ermöglicht die automatisierte Zuordnung von Kreuzpeaks direkt in $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY-Spektren auf Basis einer vorzugebenden Assignment-Tabelle der auftretenden chemischen Verschiebungen, deren Integration und anschließende Extraktion der enthaltenen Abstandsinformationen, sowie in Kombination mit einem geeigneten *Molecular Dynamics Simulator* die iterative Berechnung von dreidimensionalen Konformationen aus diesen Daten.

Für die Aufbereitung und Zurverfügungstellung der notwendigen Input-Daten des Algorithmus und die MD-Simulation sind jedoch weitere Programme von Nöten.

Die Aufnahme der zu jedem NOESY gehörenden FID's der einzelnen Proben erfolgt mithilfe des Programms *TOPSPIN* der Firma Bruker. Die anschließende Prozessierung des jeweils resultierenden zweidimensionalen Datensatzes, mit dem Ziel ein NOESY-Spektrum als Input für die 3D-Strukturberechnung zu erhalten, wird in drei Schritten realisiert.

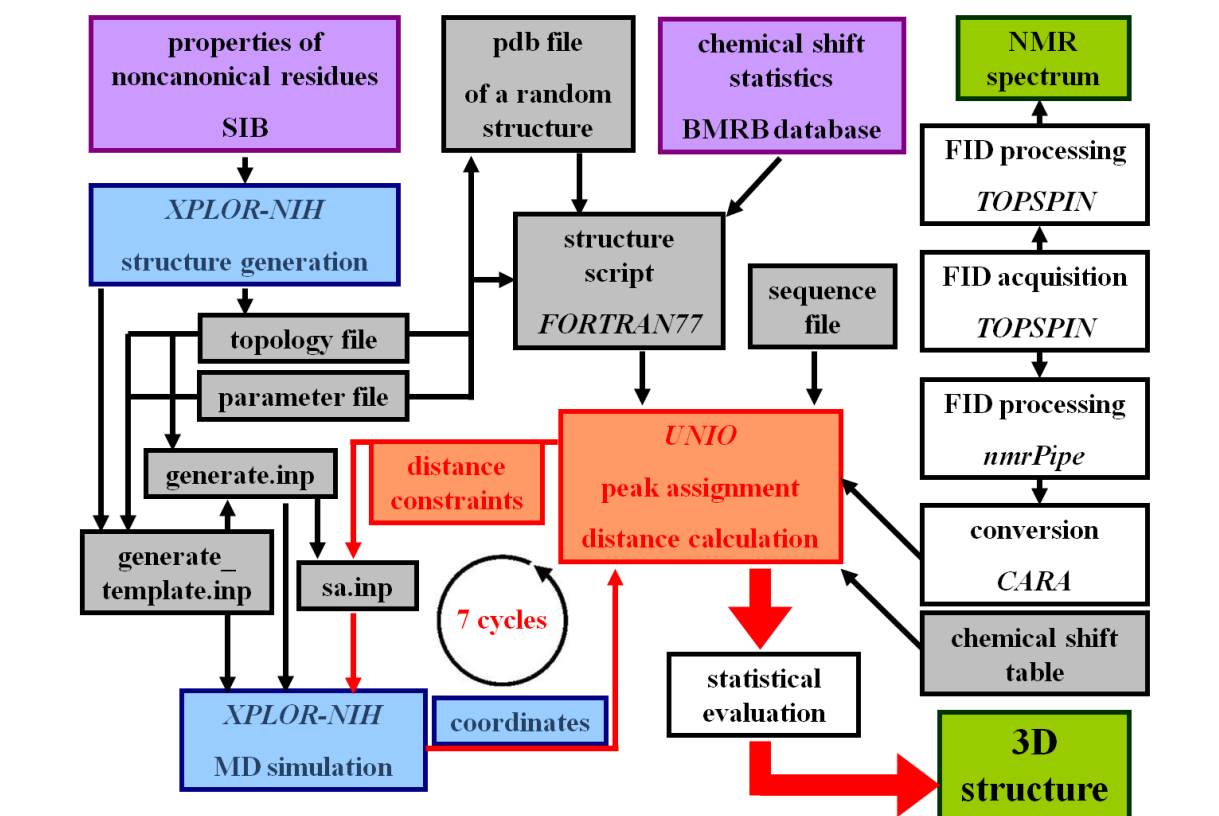


Abb. 17: Software-System zur Berechnung von dreidimensionalen Peptidstrukturen auf Basis von NMR-spektroskopisch bestimmten distance restraints

(Farberklärung: rot ... durch Programmkomponenten der Software *UNIO* realisierte Schritte; blau ... durch Programmkomponenten der Software *XPLOR-NIH* realisierte Schritte; violett ... aus speziellen Datenbanken zusätzlich eingebundene Daten; grau ... Skripte, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die Anwendung auf synthetische Peptide erstellt bzw. modifiziert wurden; weiß ... Software für die Aufnahme und Prozessierung von NMR-Spektren; grün ... finale Ergebnisse)

Zunächst werden die FID-Daten mithilfe des kleinen Programms *bruk2pipe* in ein Dateiformat konvertiert, welches von dem NMR-Prozessierungsprogramm *nmrPipe* verwendet werden kann [Delaglio et al., 1995]. Dieses Programm wird dankenswerter Weise von den "United States National Institutes of Health" (NIH) zur Verfügung gestellt und wird auf einem Linux-basierten Betriebssystem (*KNOPPIX 7.0*; *Ubuntu 12.10*) verwendet. Dabei ist zu beachten, dass das Programm mit den zu erstellenden Skripten in einem *XTerminal* unter Verwendung der *cs*h oder *tc*sh ausgeführt werden muss. Mithilfe von *nmrPipe* werden die nötigen Prozessierungsschritte wie etwa anzuwendende Fensterfunktionen, polynomische Basislinienkorrektur, komplexe Fouriertransformation und Phasenkorrekturen durchgeführt. In Vorbereitung auf die automatisierte Strukturberechnung werden außerdem die Diagonalpeaks und die Lösungsmittelpicks entfernt. Das resultierende Spektrum wird als *.f2-file* ausgegeben und muss im Anschluss unter Nutzung des von Dr. R. Keller entwickelten

Programms *CARA*, welches im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf einem *Microsoft Windows 7*-Betriebssystem verwendet wird, in ein *XEASY*-Format konvertiert werden [Keller, 2004].

Zusätzlich zu dem NOESY-Spektrum wird eine Assignment-Tabelle benötigt. Diese wird manuell mithilfe eines einfachen Texteditors im *XEASY*-Format erstellt.

Neben den spektralen Informationen sind auch umfangreiche Informationen über die kovalente Struktur des zu berechnenden Peptides erforderlich. Ein notwendiger *sequence file*, der lediglich eine Angabe über die Anzahl der im Peptid enthaltenen Aminosäurereste und deren Abfolge beinhaltet, wird jeweils mit einem Texteditor manuell erzeugt. Die darüber hinaus benötigten quantenchemischen Daten müssen hingegen aus geeigneten Molekülberechnungen entnommen werden.

Das auf einer Linux-Oberfläche zu betreibende Programm *XPLOR-NIH*, welches wiederum vom NIH zur Verfügung gestellt wird, ist für die Strukturberechnung von besonderer Bedeutung, da es neben der Generierung der als initialem Input benötigten Strukturdaten im Verlauf der Berechnung auch als *Molecular Dynamics Simulator* zum Einsatz kommt [Schwieters et al., 2003; Schwieters et al., 2006]. *XPLOR-NIH* ist bereits in der Lage, klassische Peptidstrukturen selbst zu generieren und enthält diesbezüglich auch umfangreiche Bibliotheken mit quantenchemischen Daten der einzelnen Aminosäurereste. Allerdings ist dieses Programm nicht konzipiert, um synthetische Peptide, wie GnRH-Antagonisten und GHRH-Analoga, ohne weiteres zu berücksichtigen. Daher fehlen Informationen zu den in diesen Molekülen zahlreich vorhandenen, nicht-kanonischen Aminosäureresten.

Die notwendigen quantenchemischen Daten für die nicht-kanonischen Aminosäuren werden der Datenbank *SwissSidechain* entnommen, die vom "Schweizer Institut für Bioinformatik" (SIB) betrieben wird [Gfeller et al., 2012 [1]; Gfeller et al., 2012 [2]]. Die Daten müssen allerdings noch in die *PYTHON*-basierte Syntax von *XPLOR-NIH* mithilfe eines Texteditors umgeschrieben werden. Bei Fehlen der Daten für die exakte Aminosäure, werden Daten aus analogen Struktureinheiten ähnlicher Reste verwendet, um die entsprechenden *topology files* und *parameter files* für die Strukturberechnung mittels *XPLOR-NIH* bewerkstelligen zu können.

Die auf diesem Wege generierten Strukturinformationen der gesamten Peptidstruktur können von *UNIO* nicht ohne weiteres verwendet werden, da die nicht-kanonischen Aminosäurereste teilweise Atomtypen beinhalten, welche in den internen Bibliotheken (z.B. für chemische Verschiebungen, die zu gewissen Vergleichen herangezogen werden) nicht definiert sind und daher zu einem Abbruch des Algorithmus mit Fehlermeldung führen. In Absprache mit

Dr. T. Herrmann wird an dieser Stelle ein kleiner Umweg gewählt. Zunächst wird unter Nutzung der zuvor beschriebenen, ergänzenden Daten mithilfe von *XPLOR-NIH* eine gestreckte Zufallsstruktur des jeweiligen Peptides als *.psf-file* und als *.pdb-file* generiert und die fehlenden NMR-spektroskopischen Daten werden aus der *BMRB databank* der "University of Wisconsin" entnommen. Mit den erhaltenen Struktur- und NMR-Daten wird dann in einem *FORTTRAN77*-Format manuell ein für *UNIO* verwendbares *structure script* mit den notwendigen Ersatzbibliotheken generiert.

Nach den beschriebenen, vorbereitenden Schritten liegen alle Input-Daten für die 3D-Strukturberechnung vor. Durch Anpassung der drei von Dr. T. Herrmann zur Verfügung gestellten Skripte *generate.inp*, *generate_template.inp* und *sa.inp* auf das konkret zu berechnende Molekül wird schließlich der wechselseitige Datentransfer und die Koordination der beiden Programme *UNIO* und *XPLOR-NIH* im Ablauf der zyklischen Strukturberechnung ermöglicht.

3.10.3 3D-Strukturberechnung und Visualisierung

Die Berechnung dreidimensionaler Strukturen wird mit dem in Abschnitt 3.10.2 dargestellten Software-System auf einem Linux-basierten Betriebssystem realisiert. Die Steuerung erfolgt über die zentrale Komponente *UNIO* mit den in Tabelle 12 aufgeführten Einstellungen.

Tabelle 12: Einstellungen des zentralen Programms *UNIO* für die NMR-basierte 3D-Strukturberechnung von GnRH-Antagonisten und GHRH-Analoga

Kategorie	Datei*	Format	Parameter	Einstellung [#]
Aminosäuresequenz	"Probe".seq	cyana		
NMR-Spektrum	"Probe".3D.param + "Probe".3D.16	xeasy	data type: spectrum type: permutation: type of solvent: waterline:	spectrum NOESY automatic "entsprechend Probe" "entsprechend Probe"
Assignment-Liste	XEASY "Probe".txt	xeasy	assignment tolerance:	0,27 ppm
Aminosäure-bibliothek	amber_GnRH- GHRH.lib	amber		
Koordination mit MD-Simulator			shell call:	xplor
MD-Algorithmus			Anzahl der berechneten Strukturen: ATNOS/CANDID-Zyklen:	100 1 - 7

* Die mit dem Platzhalter "Probe" versehenen Dateien sind für jede untersuchte Peptidspezies separat zu erstellen.

Das verwendete, perdeuterierte Lösungsmittel ist entsprechend der jeweiligen Probenherstellung anzugeben und die Position der Wasserlinie in ppm aus den NOESY-Spektren zu bestimmen.

Die statistische Evaluierung der finalen Strukturergebnisse und die Visualisierung der Peptid-Rückgratstrukturen und -strukturbündel erfolgt mithilfe von *UNIO*, während die Visualisierung einzelner Konformere samt Seitenketten unter Nutzung des Programms *SwissPdbViewer (V4.1.0)* des Schweizer Instituts für Bioinformatik vorgenommen wird.

Die berechneten Molekülstrukturen aller GnRH-Antagonisten befinden sich in Form von *.pdb-files* auf der Anhang-DVD unter "NMR-Material/pdb-files".

3.11 Bestimmung des Phenolgehaltes von Tanninproben mithilfe eines FeCl_3 -Assays

3.11.1 Durchführung der Bestimmung

Zur Bestimmung des Phenolgehaltes wird das Prinzip des von SHAVER ET AL., 2001 beschriebenen Verfahren angewendet. Hierfür werden in der Regel 100 μl einer tanninhaltigen Probelösung mit 850 μl 70 %igem Ethanol vermischt, anschließend mit 50 μl einer frisch zu bereitenden, 1 %igen Eisen(III)-chlorid-Lösung in Reinstwasser versetzt und für 15 min bei 40 °C im Wasserbad inkubiert. Die Absorption der dabei gebildeten blauen Komplexe wird UV/vis-spektroskopisch bei 575 nm gemessen, wobei die in Tabelle 8 angegebenen Aufnahmeparameter zur Anwendung kommen. Liegt die gemessene Extinktion über 1,0, wird entsprechend stärker mit 70 %igem Ethanol verdünnt.

3.11.2 Kalibrierung für verschiedene Tanninspezies

Da die Reaktion des jeweiligen Phenols mit dem Eisen(III)-chlorid-Reagens nicht vollständig abläuft, besteht in gewissen Grenzen eine Abhängigkeit der Methode vom eingesetzten Phenol. Abb. 18 zeigt die Kalibriergeraden für Konzentrationsreihen von Gallussäure und der ungetrennten Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis*.

Die in Abb. 18 offensichtliche Diskrepanz zwischen dem Verhalten von Gallussäure und der Gallotanninmischung verbietet eine absolute Angabe des Phenolgehaltes auf dieser Basis. Daher werden die mithilfe dieser Methode bestimmten Phenolgehaltswerte der in der vorliegenden Arbeit betrachteten Tanninfraktionen und -spezies stets unter Verwendung der für Gallussäure ermittelten Kalibriergleichung in Form von "mg GAE/ml" (GAE: gallic acid equivalents) angegeben.

Abb. 19 zeigt die entsprechenden Kalibriergeraden für die in der Endphase der vorliegenden Arbeit verfügbar gewordenen, finalen Tanninspezies der methanolytischen Trennung der Gallotanninmischung. Es zeigt sich hierbei, dass keine gravierende Abhängigkeit der

bestimmten Messwerte von der konkret untersuchten Tanninspezies zu beobachten ist und daher die Vergleichbarkeit der mithilfe dieser Methode bestimmten Tanninquantitäten in gewissen Grenzen durchaus gewährleistet ist.

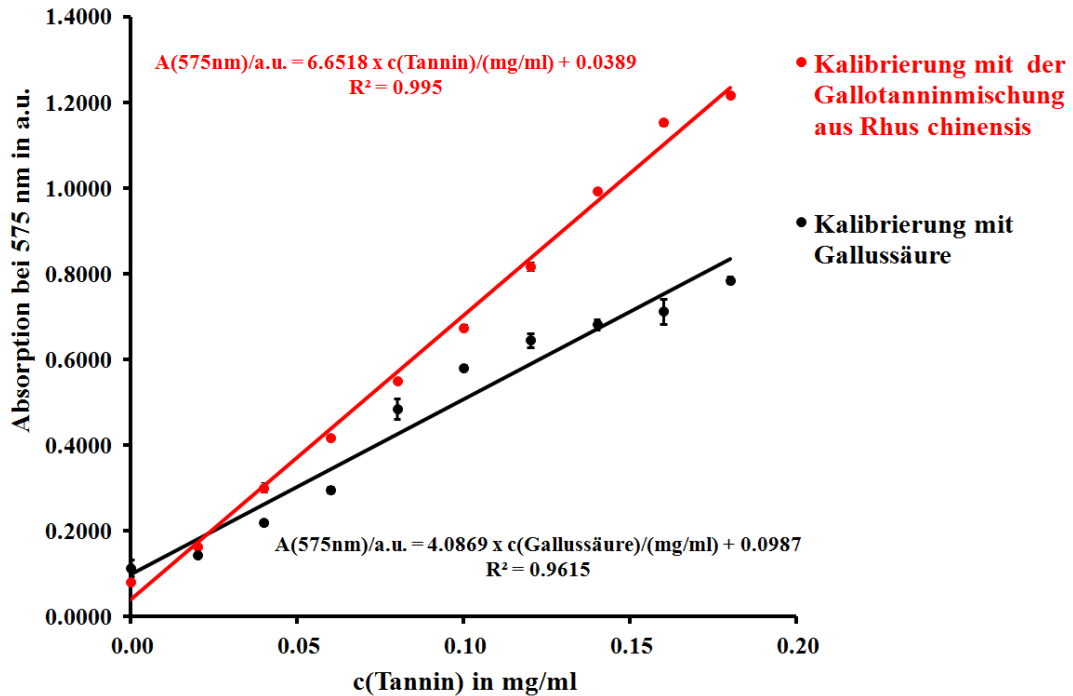


Abb. 18: Kalibriergeraden der Phenolgehaltsbestimmung mit Eisen(III)-chlorid-Reagens für Gallussäure und die ungetrennte Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis*

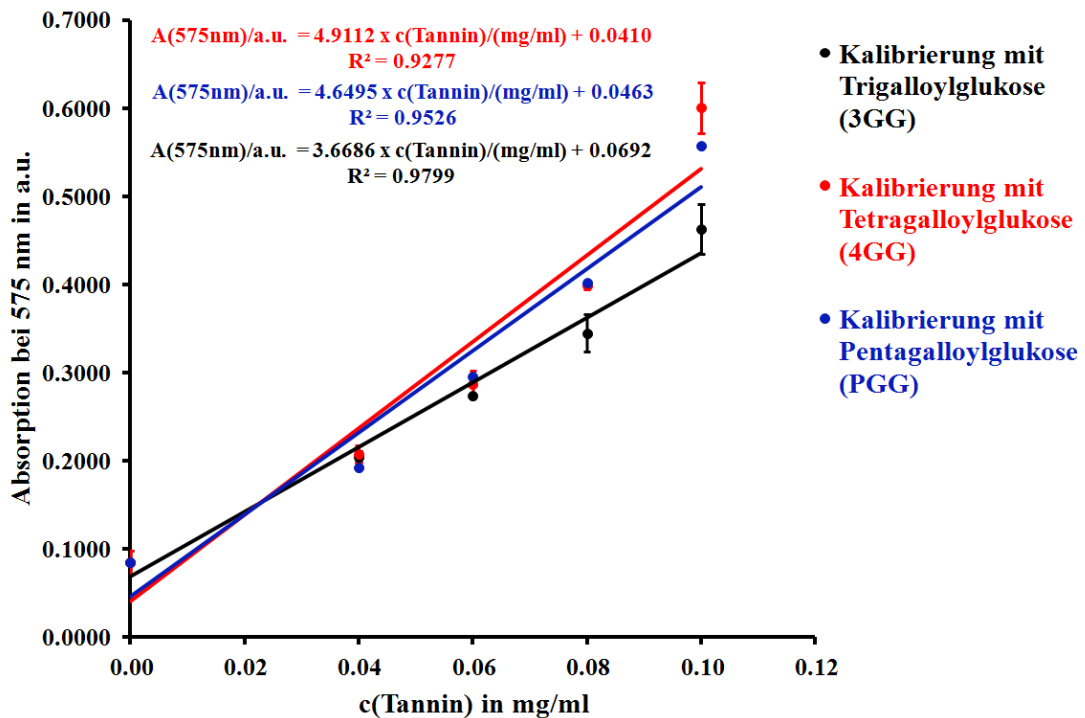


Abb. 19: Kalibriergeraden der Phenolgehaltsbestimmung mit Eisen(III)-chlorid-Reagens für die drei Tanninspezies 3GG, 4GG und PGG

3.12 Chromatographische Trennung der Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis*

3.12.1 Stufenelution an Sephadex LH-20

Die Adsorption von Tanninen an das Material Sephadex LH-20 und deren anschließende, mehr oder weniger selektive Elution durch organische Lösungsmittelgemische mit Wasser wurden in zahlreichen Publikationen als Trennprinzip für Tannine beschrieben [Nishizawa et al., 1982; Okuda et al., 1989; Mueller-Harvey, 2001; Arapitsas et al., 2007; Tian et al., 2009]. In der vorliegenden Arbeit wird auf Basis der von TIAN ET AL., 2009 beschriebenen Variante, die einen linearen Gradienten von Lösungsmittelgemischen aus Wasser, Ethanol und Aceton beinhaltet, ein Verfahren mit mehreren Elutionsstufen entwickelt, welches eine effiziente Trennung der Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* in mehrere Fraktionen erlaubt. Aufbauend auf diesem Grundprinzip erfolgte im Rahmen der Bachelorarbeit von B.Sc. J. Bergmann eine umfangreiche Optimierung der notwendigen Elutionsbedingungen [Bergmann, 2013]. Im Folgenden wird daher ausschließlich das resultierende, optimierte Standardverfahren dargestellt.

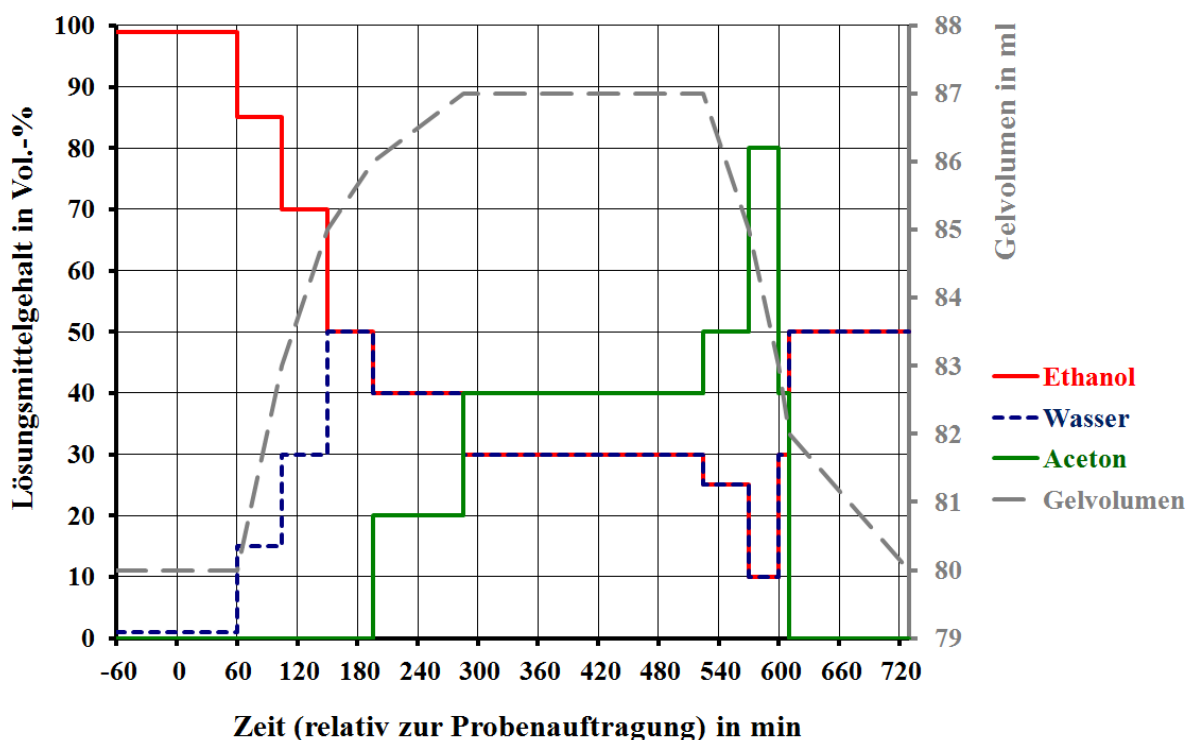


Abb. 20: Zeitlicher Ablauf des optimierten Elutionsprogrammes der Stufentrennung der Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* an Sephadex LH-20

Die Chromatographie wird an der in Abschnitt 3.2.2 vorgestellten Anlage durchgeführt. 1 g der Gallotanninmischung werden unter Rühren bei RT in 2 ml 99 %igem, vergällten Ethanol gelöst, wobei eine klare, intensiv gelb gefärbte Lösung entsteht. Diese wird mithilfe einer Pasteurpipette gleichmäßig auf das Sephadex LH-20-Gelbett aufgetragen, welches zuvor für mindestens 60 min unter Fluss bei 1 ml/min in 99 %igem, vergällten Ethanol äquilibriert wird. Die Probe wird langsam durch Öffnen des unteren Verschlussahnes der Säule in das Gelbett eingelassen und dreimal mit je 3 ml Ethanol vorsichtig nachgespült. Im Anschluss werden mindestens 25 ml Ethanol über das Gel geschichtet, die Säule mit der Pumpenzuführung luftdicht verschlossen und die Chromatographie bei einem Fluss von 1 ml/min begonnen. Das große Volumen zum Übersichten der Säule ist erforderlich, da das Sephadex LH-20-Gel im Verlauf der Chromatographie infolge der stark unterschiedlichen Elutionsmittel starken Quellungsschwankungen unterliegt. Abb. 20 visualisiert den zeitlichen Ablauf und die Zusammensetzung der optimierten Elutionsstufen, sowie die dabei typischerweise auftretende Volumenänderung des Gelbettes aufgrund der variierenden Quellungsbedingungen.

Es erfolgt eine fraktionierte Sammlung des Eluates in 9 min- bzw. in 9 ml-Fraktionen. Aufgrund des variierenden Aceton-Gehaltes im Verlauf der Chromatographie ist eine online-UV-Detektion für einen großen Teil der Trennung nicht zielführend in der Verfolgung der Tanninelution. Daher wird in allen separierten Fraktionen unter Anwendung des in Abschnitt 3.11 beschriebenen Verfahrens der Phenolgehalt bestimmt und daraus das entsprechende Elutionschromatogramm generiert. Bei Befolgung des dargelegten Protokolls sind die gesammelten Fraktionen gemäß Tabelle 13 zu vereinigen.

Tabelle 13: Übersicht der mittels Stufenelution an Sephadex LH-20 getrennten Tanninfraktionen

Bezeichnung der Tanninfraktion	Kurzbezeichnung	vereinigte Fraktionen	Retentionszeit
Tanninfraktion 1	TaF1	30 - 33	261 - 297 min
Tanninfraktion 2	TaF2	34 - 38	297 - 342 min
Tanninfraktion 3	TaF3	39 - 43	342 - 387 min
Tanninfraktion 4	TaF4	44 - 48	387 - 432 min

Die Lagerung der Proben erfolgt zwecks Vermeidung von Hydrolyseerscheinungen mit samt den enthaltenen organischen Lösemitteln in einem luftdicht verschlossenen Gefäß bei 4 °C im Kühlschrank für maximal 4 Wochen. Für die weiterführende Trennung bzw. die Analytik der Tanninfraktionen werden die organischen Lösungsmittelbestandteile im Vakuum bei 40 °C an einem Rotationsverdampfer entfernt und bei 50 mbar bis auf wenige Milliliter eingengt.

3.12.2 Semi-präparativen HPLC an einer RP-8-Säule

Die Entwicklung optimierter Verfahren zur weiteren Auftrennung der nach Abschnitt 3.12.1 gewonnenen Tanninfraktionen TaF1 - TaF4 mithilfe semi-präparativer HPLC erfolgte im Rahmen der Bachelorarbeit von B.Sc. C. Grundmann [Grundmann, 2014]. Es werden hier nur die finalen, optimierten Trennprotokolle behandelt.

Die semi-präparative HPLC wird an der in Abschnitt 3.2.7 dargestellten Anlage durchgeführt. Als stationäre Phase dient eine semi-präparative RP-8-Säule und zur Elution werden lineare Gradienten aus Reinstwasser und Methanol mit je 0,01 % Trifluoressigsäure bei einem konstanten Fluss von 5ml/min eingesetzt. Das Probenauftragsvolumen wird zwischen 1,2 ml und 3,2 ml variiert und die Detektionswellenlänge wird auf 278 nm bzw. bei hochkonzentrierten Proben auf 320 nm eingestellt. Das Eluat wird jeweils in 3 min- bzw. 15 ml-Fractionen gesammelt.

Tabelle 14 gibt einen Überblick über den zeitlichen Ablauf der verwendeten Elutionsprogramme.

Tabelle 14: Elutionsprogramme der Auftrennung der Tanninfraktionen TaF1 - TaF4 mittels semi-präparativer HPLC an einer RP-8-Säule

Tannin-fraktion	Endpunkt des linearen Gradienten in min	Methanolgehalt am Endpunkt des linearen Gradienten in Vol.-%	Tannin-fraktion	Endpunkt des linearen Gradienten in min	Methanolgehalt am Endpunkt des linearen Gradienten in Vol.-%
TaF1	0	10	TaF3	0	10
	1	10		1	10
	10	22		10	29
	55	30		70	40
	75	88		80	88
	90	10		95	10
TaF2	0	10	TaF4	0	10
	1	10		1	10
	10	25		5	30
	70	36		60	42
	80	88		70	88
	95	10		85	10

Die jeweils gesammelten Fraktionen werden, wie in Tabelle 15 aufgelistet, vereinigt und für die Weiterverwendung am Rotationsverdampfer bei 40 °C weitgehend von Methanol befreit und bei 50 mbar auf wenige Milliliter eingengt.

Tabelle 15: Übersicht der mittels semi-präparativer HPLC getrennten Teilfraktionen der Tanninfraktionen TaF1 - TaF4

aufgetrennte Tanninfraktion	Kurzbezeichnung der Teilfraktion	vereinigte Fraktionen	Retentionszeit
Tanninfraktion TaF1	TaF1 Peak1	9 - 12	24 - 36 min
	TaF1 Peak2	13 - 17	36 - 51 min
Tanninfraktion TaF2	TaF2 Peak1	10 - 12	27 - 36 min
	TaF2 Peak2	13 - 15	36 - 45 min
	TaF2 Peak3	16 - 19	45 - 57 min
Tanninfraktion TaF3	TaF3 Peak1	10 - 12	27 - 36 min
	TaF3 Peak2	13 - 15	36 - 45 min
	TaF3 Peak3	16 - 22	45 - 66 min
Tanninfraktion TaF4	TaF4 Peak1	9 - 12	24 - 36 min
	TaF4 Peak2	13 - 15	36 - 45 min
	TaF4 Peak3	16 - 20	45 - 60 min

3.13 Methanolytische Gewinnung von Reinsubstanzen aus der Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis*

3.13.1 Methanolytische Spaltung der Depsidbindungen und Aufarbeitung der Methanolyseprodukte

Die Etablierung des im Folgenden beschriebenen Methanolyseverfahrens wurde im Rahmen eines Praktikums von B.Sc. P. Körner vorgenommen und in der vorliegenden Arbeit nur geringfügig modifiziert und um semi-präparative HPLC-Stufen erweitert. Der Ablauf des Trennverfahrens ist in Abb. 21 schematisch dargestellt.

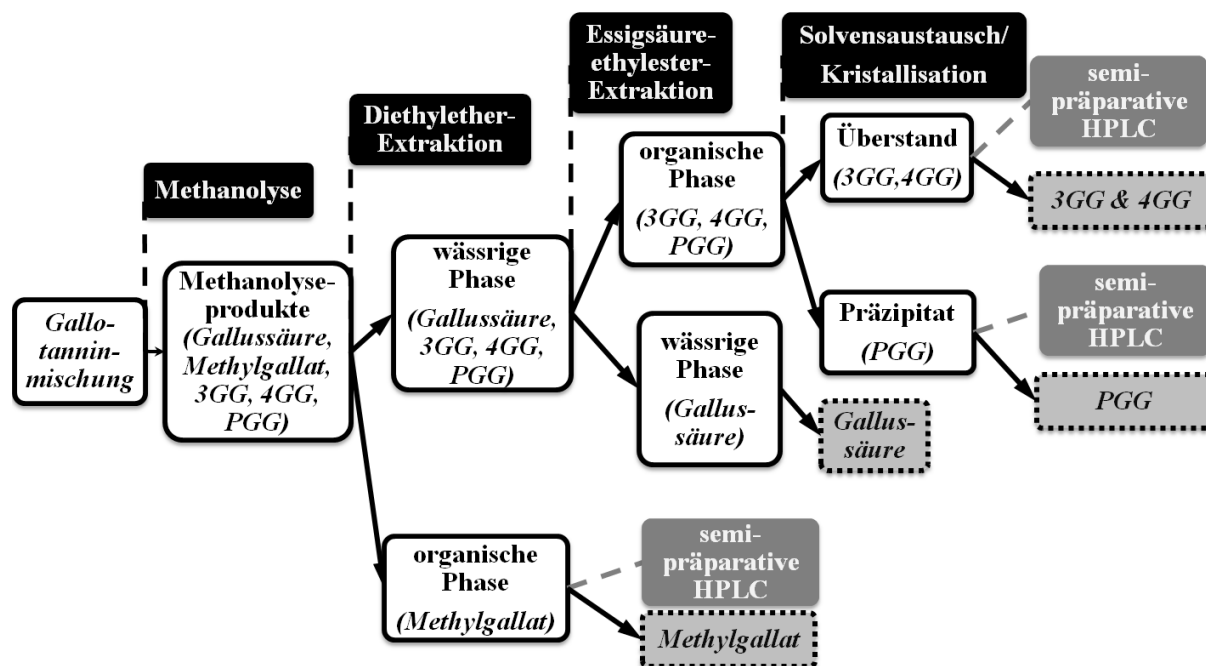


Abb. 21: Schematische Übersicht der wesentlichen Teilschritte der Gewinnung einzelner Tanninspezies über ein methanolyse-basiertes Trennverfahren

Es sind 4 g der Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* zunächst in 60 ml Methanol unter Rühren zu lösen, wobei eine klare, intensiv gelb gefärbte Lösung entsteht. Diese ist mit 24 ml einer 0,1 M Ammoniumacetat-Lösung (pH 5,0) zu vermischen und für 24 h bei 75 °C zu rühren. Die Lösung nimmt währenddessen eine bräunliche Farbe an. Für die Gewinnung größerer Substanzmengen werden alle Mengenangaben bis zum 5-fachen linear aufskaliert.

Der Methanolanteil der Reaktionsmischung wird am Rotationsverdampfer bei 40 °C weitgehend entfernt und die verbleibende wässrige Lösung mindestens fünfmalig mit jeweils ca. 10 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigte Etherphase wird am Rotationsverdampfer bei 40 °C bis zur Trockne eingeeengt, der Rückstand in wenigen Millilitern Methanol aufgenommen und für die Gewinnung von Methylgallat mittels semi-präparativer HPLC verwendet. Die wässrige Phase der Etherextraktion wird hingegen mindestens viermalig mit je ca. 15 ml Essigsäureethylester einer weiteren Extraktion unterzogen. Die wässrige Phase wird am Rotationsverdampfer bei 40 °C von Essigsäureethylester-Resten befreit und für rein analytische Zwecke weiterverwendet. Die vereinigte Esterphase wird hingegen zunächst am Rotationsverdampfer bei 40 °C auf ca. 10 ml eingeeengt, mit 20 ml Reinstwasser versetzt, anschließend Essigsäureethylester-Reste entfernt und bei 50 mbar auf ca. 8 ml eingeeengt.

Die resultierende, noch 40 °C warme, wässrige Lösung wird in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für mindestens 24 h bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert, wodurch eine Fällung von 1,2,3,4,6-O-Pentagalloyl- β -D-Glukose in Form eines weißen Feststoffes ausgelöst wird. Durch Zentrifugation bei 4000 rpm werden Überstand und Präzipitat voneinander separiert. Der Überstand wird für die Isolierung der finalen Tanninspezies Trigalloylglukose (3GG) und Tetragalloylglukose (4GG) genutzt. Das Präzipitat wird zunächst zweimalig mit wenigen Millilitern kaltem, entionisiertem Wasser gewaschen, mit ca. 10 ml Reinstwasser versetzt und durch Inkubation bei 50 °C für 10 min im Wasserbad wieder gelöst, bevor durch erneute Lagerung für 24 h bei 4 °C ein Umkristallisierungsschritt durchgeführt wird.

3.13.2 Semi-präparative HPLC an einer RP-8-Säule

Die semi-präparative HPLC zur Gewinnung und Reinigung einzelner, finaler Tanninspezies aus dem in Abschnitt 3.13.1 dargestellten Trennverfahren erfolgt unter Nutzung der in Abschnitt 3.2.7 aufgeführten HPLC-Anlage mit den in Abschnitt 3.12.2 für die Trennung anderer Tanninfraktionen beschriebenen Laufmitteln und Geräteeinstellungen. Das für die Trennung und Reinigung aller Methanolyseprodukte einheitlich verwendete Gradienten-

programm ist Tabelle 16 zu entnehmen. Tabelle 16 gibt gleichzeitig eine Übersicht der zur Isolierung bestimmter Komponenten standardmäßig zu vereinigenden Fraktionen.

Tabelle 16: Gradientenprogramm der Trennung und Reinigung von Methanolyseprodukten der Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* mittels semi-präparativer HPLC und Übersicht zu vereinigender Fraktionen

Gradientenprogramm		für Isolierung zu sammelnde Fraktionen		
Endpunkt des linearen Gradienten in min	Methanolgehalt am Endpunkt des linearen Gradienten in Vol.-%	isolierte, finale Tanninspezies	vereinigte Fraktionen	Retentionszeit
0	10	Methylgallat	9 & 10	24 - 30 min
1	10	3GG	8	21 - 24 min
5	25			
45	36	4GG	11 & 12	30 - 36 min
50	88			
60	10	PGG	17 - 19	48 - 57 min
65	10			

Aufgrund im Zeitraum der Arbeit aufgetretener technischer Probleme an der verwendeten HPLC-Anlage, die zu verringerten bzw. zeitweilig erhöhten Werten für den Fluss und den damit zusammenhängenden Druck während der Chromatographie führten, entstanden teilweise entlang der Zeitachse gestreckte bzw. gestauchte Chromatogramme, welche die semi-präparative Trennung jedoch nicht grundsätzlich verschlechterten. Infolgedessen wird standardmäßig jede in Frage kommende, gesammelte Fraktion zunächst unter Nutzung der in Abschnitt 3.15 erläuterten, analytischen HPLC-Verfahren für Methanolyseprodukte bei einer 20-fachen Verdünnung mit Methanol untersucht, bevor entsprechende Fraktionen vereinigt werden.

Für die in Einzelfällen durchgeführte Rechromatographie der isolierten Verbindungen werden die vereinigten Fraktionen am Rotationsverdampfer bei 40 °C und einem Minimaldruck von 50 mbar bis auf wenige Milliliter Restvolumen eingengt und erneut unter Verwendung des in Tabelle 16 dargestellten Gradientenprogrammes chromatographiert.

Zur semi-präparativen Gewinnung von PGG wird entweder das entsprechende Präzipitat der des Kristallisationsschrittes oder der ungetrennte Kristallisationsansatz nach erfolgter Essigsäureethylester-Extraktion und Solvensaustausch gegen Reinstwasser mit 20 Vol.-% Methanol versetzt, um PGG in Lösung zu bringen bzw. zu halten, und anschließend chromatographiert. Es muss in jedem Fall darauf geachtet werden, dass das mit Wasser nicht mischbare Lösungsmittel Essigsäureethylester vor Probenauftragung entfernt wird.

3.14 Untersuchungen zu Besonderheiten der Methanolyse der Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis*

3.14.1 Untersuchung des Phasenverhaltens von 1,2,3,4,6-Pentagalloylglukose (PGG) in Gegenwart von Gallussäure und Methylgallat

Eine Stammlösung von gemäß Abschnitt 3.13 isolierter PGG zu 10 mg GAE/ml in Reinstwasser wird durch Inkubation bei 50 °C hergestellt und mit einer weiteren Stammlösung von Gallussäure bzw. von ebenfalls gemäß Abschnitt 3.13 isoliertem Methylgallat zu je 50 mg GAE/ml in Reinstwasser bei 50 °C zusammenpipettiert. Dabei werden in verschließbaren Glasküvetten jeweils 1 ml der PGG-Stammlösung vorgelegt und die entsprechende Menge an Gallussäure- bzw. Methylgallat-Stammlösung zugegeben, um Gallussäure/PGG- bzw. Methylgallat/PGG-Massenverhältnisse von 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 2,0 und 5,0 herzustellen. Anschließend ist jede Probe auf 2 ml Gesamtvolumen mit Reinstwasser aufzufüllen, gut zu durchmischen und im verschlossenen Gefäß für je 30 min im Wasserbad bei mehreren exakt einzuhaltenden Temperaturen zwischen 22,5 °C und 40,5 °C zu inkubieren. Nach der Inkubationszeit werden die Proben aus dem Wasserbad genommen, fotografiert und wieder in das Wasserbad gesetzt.

Die beschriebene Messreihe mit Methylgallat wurde im Rahmen der Masterarbeit von B.Sc. P. Körner [Körner, 2015] realisiert.

3.14.2 Analytische Alkoholysen der Tanninmischung mit Ethanol und *n*-Propanol

Die analytischen Alkoholysen mit Ethanol bzw. *n*-Propanol wurden im Rahmen eines Praktikums von B.Sc. P. Körner durchgeführt und im Rahmen der vorliegenden Arbeit für weiterführende analytische Zwecke genutzt.

45 mg bzw. 72 mg der Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* sind in 1,0 ml Ethanol bzw. *n*-Propanol zu lösen und mit je 430 µl einer 0,1 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,0) zu vermischen. Die Proben werden für 3 h bei 65 °C und 500 rpm in einem Thermoschüttler inkubiert und anschließend auf RT abgekühlt. Zwecks Untersuchung der Proben mittels LC-MS/MS werden 100 µl Aliquote entnommen und mit 900 µl Reinstwasser verdünnt.

3.15 Analytische Gradienten-HPLC zur Untersuchung von Tanninfraktionen und -spezies

3.15.1 Parameter der Gradienten-HPLC

Analytische HPLC-Untersuchungen an Tanninfraktionen und -spezies werden mit den beiden HPLC-Anlagen aus Abschnitt 3.2.5 und Abschnitt 3.2.6 realisiert. Beide Anlagen sind zu großen Teilen baugleich. Der wesentliche Unterschied besteht darin, dass einerseits ein UV-Detektor, der zur Aufzeichnung einer Detektorspur bei einer einzelnen Wellenlänge verwendet wird, zum Einsatz kommt und andererseits ein DAD-Modul, welches ganze Spektren liefert. Tabelle 17 stellt die für beide Anlagen weitgehend identischen Aufnahmeparameter dar.

Tabelle 17: Aufnahmeparameter der analytischen Gradienten-HPLC-Anlage zur Untersuchung von Tanninfraktionen und -spezies

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
Fluss	0,5 ml/min	Eluent A	Methanol mit 0,01 % TFA
Druck	2 - 3 kpsi	Eluent B	Wasser mit 0,01 % TFA
Temperatur	25 °C	Detektion Anlage 1 Detektion Anlage 2	bei 278 nm Spektrum: 190 - 600 nm
Injektionsvolumen	75 µl		
Trennmethode	Gradienten		

Tabelle 18: Optimierte Gradientenprogramme der analytischen HPLC an einer C-18-Säule zur Untersuchung verschiedener Tanninfraktionen

Tannin-fraktion	Endpunkt des linearen Gradienten in min	Methanolgehalt am Endpunkt des linearen Gradienten in Vol.-%	Tannin-fraktion	Endpunkt des linearen Gradienten in min	Methanolgehalt am Endpunkt des linearen Gradienten in Vol.-%
TaF1	0	10	TaF3	0	10
	1	10		1	10
	10	35		5	41
	40	35		40	43
	60	88		60	88
	70	10		70	10
TaF2	0	10	TaF4	0	10
	1	10		1	10
	10	40		5	42
	50	40		20	46
	80	58		65	57
	90	88		70	88
	100	10		75	10
Methanolyse-/Alkoholyse-Produkte	0	10			
	1	10			
	5	36			
	30	48			
	35	100			
	40	100			
	45	10			

Die verschiedenen Tanninfraktionen und -spezies werden nach den in Tabelle 18 zusammengestellten, optimierten Gradientenprogrammen analysiert. Die Optimierung der HPLC-Programme erfolgte für TaF1 und TaF2 in der Bachelorarbeit von B.Sc. P. Körner [Körner, 2013], für TaF3 und die Methanolyse- bzw. Alkoholyseprodukte in einem Praktikum von B.Sc. P. Körner und für TaF4 im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit.

3.15.2 Kalibrierreihen für verschiedene, isolierte Tanninspezies

Mit dem Ziel, ein exakteres Verfahren zur Quantifizierung einzelner Tanninspezies als den in Abschnitt 3.11 beschriebenen Eisen(III)-chlorid-Assay zu etablieren, werden Kalibrierreihen der gemäß Abschnitt 3.13 isolierten, finalen Tanninspezies 3GG, 4GG und PGG generiert, indem die einzelnen Verbindungen nach der semi-präparativen HPLC am Rotationsverdampfer bei 40 °C von organischen Lösemittelbestandteilen befreit und auf wenige Milliliter eingeeengt, anschließend bei -32 °C tiefgefroren und lyophilisiert werden. Aus dem Lyophilisat werden Stammlösungen zu 0,60 mg/ml in 50 %igem Methanol hergestellt und in Doppelansätzen daraus Kalibrierproben zu 0,05 mg/ml, 0,10 mg/ml, 0,20 mg/ml, 0,40 mg/ml und 0,60 mg/ml angesetzt.

Die Proben werden jeweils nach dem in Tabelle 18 angegebenen Gradientenprogramm für Methanolyse- bzw. Alkoholyseprodukte chromatographiert und bei 278 nm detektiert.

3.16 LC-MS/MS- und NMR-Untersuchungen an Tanninspezies und an Tanninfraktionen

3.16.1 Untersuchung der Molekül-Ion-Massen der Tanninfraktionen

Die LC-MS/MS-Messungen der vorliegenden Arbeit wurden dankenswerterweise am Lehrstuhl für Wasserchemie der Technischen Universität Dresden durch M.Sc. L. Richter durchgeführt. Für die Messungen wird die in Abschnitt 3.2.8 im Detail dargestellte Anlage verwendet. Aufgrund der besonderen Reinheitsanforderungen für massenspektroskopische Analysen werden in diesem Fall für LC/MS geeignete Laufmittel eingesetzt, wobei Gradienten aus einem Eluenten A (Methanol/Wasser/Methansäure im Mischungsverhältnis 95/5/0,015 (v/v/v)) und einem Eluenten B (Wasser/Methanol/Methansäure im Mischungsverhältnis 95/5/0,015 (v/v/v)) nach Programmen genutzt werden, welche den korrespondierenden Gradientenprogrammen aus Tabelle 18 gleichen. Dabei ist jedoch eine

Anpassung der zu den jeweiligen Zeitpunkten zu erreichenden Mischungsverhältnissen beider Eluenten so vorzunehmen, dass der in den hierfür verwendeten Laufmitteln enthaltene, 5 Vol.-% betragende Anteil des jeweils anderen Eluenten Berücksichtigung findet. Die verwendeten Aufnahmeparameter des MS-Detektors sind Tabelle 19 zu entnehmen.

Tabelle 19: Aufnahmeparameter der LC-MS/MS-Untersuchungen zu Molekülionmassen von Tanninfraktionen

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
Polarity	negative	Curtain gas	10 psi
Source temperature	500 °C	Ion source gas 1	50 psi
Ion spray voltage	-5 kV	Ion source gas 2	50 psi

Es werden entsprechende Messungen an wässrigen Lösungen der gemäß Abschnitt 3.12 hergestellten Tanninfraktionen TaF1, TaF2, TaF3 und TaF4, sowie an Proben der Gallotanninmischung, die für 6 h einer Methanolyse gemäß Abschnitt 3.13 bzw. für 3 h einer Ethanolyse oder *n*-Propanolyse nach Abschnitt 3.14.2 zu unterziehen sind. Die Messungen an den Tanninfraktionen TaF3 und TaF4 erfolgten im Rahmen eines Praktikums von B.Sc. P. Körner.

Darüber hinaus wird die Interaktion zwischen Cetorelix und den Tanninfraktionen TaF1 und TaF2 in der Form untersucht, dass für jede der genannten Tanninfraktionen jeweils 0,5 ml einer Stammlösung zu 2 mg GAE/ml in Reinstwasser zum einen mit 0,5 ml einer Cetorelix-Stammlösung zu 1 mg/ml in 10 mM Ammoniumacetat-Lösung (pH 7,0) versetzt werden und zum anderen mit 0,5 ml einer peptidfreien 10 mM Ammoniumacetat-Lösung (pH 7,0). Die Proben werden jeweils gut durchmischt, für 60 min bei RT inkubiert und anschließend bei 4000 rpm zentrifugiert. Die LC-MS/MS-Analyse erfolgt anhand des unverdünnten Überstandes der Lösungen.

3.16.2 Untersuchungen zur Struktur einer unbekannten Verbindung mit $m/z = 680$ aus der Methanolyse der Gallotanninmischung durch Fragmentierung und Tochterionen-Scan

Zwecks näherer Charakterisierung einer während der Methanolyse der verwendeten Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* entstandenen Verbindung mit dem Masse/Ladungs-Verhältnis $m/z = 680$ wurde im Rahmen eines Praktikums von B.Sc. P. Körner ein Tochterionenscan realisiert. Hierfür wird ein separater LC-MS/MS-Lauf für die oben angeführte Probe der Gallotanninmischung nach einer sechsstündigen Methanolyse unter Nutzung des für Methanolyseprodukte angegebenen Gradientenprogramms aus

Abschnitt 3.15.1 mit den in Abschnitt 3.16.1 erläuterten Anpassungen an die veränderten Eluentenzusammensetzung der LC-MS/MS-Anlage durchgeführt. Der erste Quadrupol Q1 des Massenanalysators wird bei diesem Experiment konstant auf das Masseladungsverhältnis $m/z = 680$ eingestellt, der zweite Quadrupol Q2 wird für eine Fragmentierung des selektierten Moleküls eingesetzt und schließlich wird mittels des dritten Quadrupols Q3 eine Analyse des resultierenden Fragmentmassenspektrums ermöglicht. Tabelle 20 enthält die hierfür verwendeten Einstellungen des Massenanalysators.

Tabelle 20: Parameter des Tochterionenscans zur näheren Charakterisierung einer Verbindung mit dem Masse/Ladungs-Verhältnis $m/z = 680$

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
Polarity	negative	Collisionally activated dissociation (CAD)	medium
Source temperature	500 °C	Declustering potential (DP)	-25,00 V
Ion spray voltage	-4 kV	Entrance potential (EP)	- 3,50 V
Curtain gas	35 psi	Cell entrance potential (CEP)	-36,78 V
Ion source gas 1	60 psi	Collision energy (CE)	-50,00 V
Ion source gas 2	60 psi	Cell exit potential (CXP)	- 1,50 V
Product of	679,5	Channel electron multiplier (CEM)	2300

3.16.3 NMR-Untersuchungen an den drei finalen Tanninspezies 3GG, 4GG und PGG

In Vorbereitung auf die NMR-Untersuchungen werden die nach der Vorschrift aus Abschnitt 3.13 mittels semi-präparativer HPLC isolierten Tanninspezies 3GG, 4GG und PGG am Rotationsverdampfer bei 40 °C und einem Minimaldruck von 50 mbar über mehrere Stunden von organischen Lösemittelresten möglichst vollständig befreit, wobei regelmäßiges Reinstwasser zu den Proben gegeben wird, um ein Antrocknen der Substanzen an die Gefäßwandung zu vermeiden. Die resultierenden wässrigen Lösungen werden bei -70 °C tiefgefroren und anschließend lyophilisiert.

Für jede Tanninspezies sind je ca. 6 mg des Lyophilisates in 600 µl DMSO- d_6 zu lösen und noch am selben Tag NMR-spektroskopisch zu messen, um Hydrolyse- oder Oxidationserscheinungen ausschließen zu können. Mit dem Ziel einer Strukturaufklärung der Verbindungen werden jeweils eindimensionale ^1H -NMR-Spektren, sowie zweidimensionale $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY- und $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren aufgenommen.

Die erhaltenen Rohdaten und daraus erzeugten NMR-Spektren sind auf der beigefügten Anhang-DVD unter "NMR-Material/NMR_Rohdaten" bzw. "NMR-Material/NMR_Spektren" zu finden.

3.17 Untersuchungen an Komplexen von Polysacchariden mit GnRH-Antagonisten

3.17.1 Ubbelohde-Viskosimetrie

Es sind Stammlösungen von Cetrorelix, *lmw* Chitosan und Amylose zu je 1 mg/ml in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) mit jeweils 14 ml Gesamtvolumen hergestellt und unter Rühren für 24 h bei RT vor Beginn der Messungen inkubiert. Die zu untersuchende Probe wird in das Ubbelohde-Viskosimeter überführt und für 20 min bei $(25,0 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$ temperiert. Anschließend erfolgt stets in Doppelbestimmung die Messung der entsprechenden Laufzeiten. Nach Entnahme der Probe wird der pH-Wert in Vorbereitung auf die weiteren Messungen am pH-Meter durch Zugabe von verdünnter Ammoniaklösung nacheinander auf pH 4,0, pH 5,0, pH 6,0, pH 7,0, pH 8,0 und pH 9,0 eingestellt und für je 30 min bei dem veränderten pH-Wert bei RT gerührt. Für jeden pH-Wert ist die beschriebene Viskositätsmessung zu wiederholen. Die Bestimmung der spezifischen Viskosität der Proben erfolgt nach Gl. 6.

$$\eta_{\text{spez}} = \frac{t}{t_0} - 1 \quad (\text{Gl. 6})$$

mit t Laufzeit der untersuchten Probe

t_0 Laufzeit des reinen Lösungsmittels

3.17.2 Fluoreszenzuntersuchungen zum Aggregationszustand von Cetrorelix in Gegenwart von Polysacchariden

Als Referenzproben werden Stammlösungen von Cetrorelix mit einer Konzentration von 0,20 mg/ml in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0), sowie in 0,1 M Ammoniumacetat-Lösungen der pH-Werte 4,0 und 5,0 so mit dem gleichen Solvens verdünnt, dass Konzentrationsreihen mit Cetrorelix-Gehalten zwischen 0,01 mg/ml und 0,10 mg/ml in Abständen von je 0,01 mg/ml mit Probenvolumina von je 1,0 ml generiert werden.

Aus der genannten Cetrorelix-Stammlösung bei pH 4,0 werden darüber hinaus Konzentrationsreihen in Gegenwart von Amylose bzw. Amylopektin mit den identischen Cetrorelix-Gehalten hergestellt, indem das jeweils notwendige Volumen an Cetrorelix-Stammlösung zunächst mit 0,5 ml einer Amylose- bzw. Amylopektin-Stammlösung mit einer Konzentration von 0,20 mg/ml in 0,1 M Ammoniumacetat-Lösung (pH 4,0) versetzt, anschließend mit der genannten Ammoniumacetat-Lösung auf 1,0 ml Probenvolumen aufgefüllt und gut durch mischt wird.

Die Lösung werden jeweils nach 24 h Inkubation bei RT und nach 7 d Inkubation bei RT fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Dabei werden die gleichen Einstellungen wie in Tabelle 6 verwendet, wobei jedoch abweichend dazu als Anregungswellenlänge 280 nm verwendet werden und die Akkumulation des Emissionsspektrums zwischen 300 und 450 nm erfolgt.

3.17.3 Untersuchung zur Präzipitation von Cetrorelix-Amylose-Komplexen bei niedrigen pH-Werten

Für die quantitative Untersuchung des Fällungsverhaltens von Cetrorelix-Amylose-Komplexen bei niedrigen pH-Werten und der Stabilität der präzipitierten Komplexe gegenüber Reinstwasser als Waschlösung werden Stammlösungen von Cetrorelix und Amylose zu je 2 mg/ml in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) hergestellt und nach zweistündigem Rühren bei RT je 2 ml der beiden Stammlösungen unter Rühren vereinigt. Parallel ist eine korrespondierende Referenzprobe in analoger Weise derart herzustellen, dass der Anteil der Amylose-Stammlösung durch 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) ersetzt wird.

Nach 30 min wird die entstandene Suspension bzw. die Referenzlösung bei 4000 rpm zentrifugiert und 400 µl des Überstandes für die fluoreszenzspektroskopische Cetrorelix-Gehalts-Bestimmung abzunehmen. Die verbleibende Suspension wird mit verdünnter Ammoniaklösung auf pH 4,0 eingestellt, wiederum 30 min bei RT gerührt, zentrifugiert und erneut 400 µl für die Fluoreszenzspektroskopie entnommen. Das beschriebene Prozedere wird für pH 5,0 wiederholt.

Die entnommenen Proben werden vor der Fluoreszenzspektroskopie durch Zugabe zuvor titrierter Volumina an 1 M Essigsäure auf pH 3,0 eingestellt und analog zu dem in Abschnitt 3.17.2 dargestellten Verfahren gemessen.

3.18 N-Acetylierung von Chitosanproben und Bestimmung des N-Acetylierungsgrades

Die N-Acetylierung von Chitosan wird nach dem Verfahren von SHOICHET ET AL., 2005 durchgeführt. Dafür werden 1,8 g Chitosan (low molecular weight) unter Rühren in 1,2 g Eisessig suspendiert und schrittweise 60 ml entionisiertes Wasser dazu gegeben. Nach 4 h Rühren wird die Lösung mit 60 ml 99 %igem Ethanol verdünnt und in drei Aliquote zu je 40 ml aufgeteilt. In die Aliquote werden 28 µl, 53 µl bzw. 80 µl Essigsäureanhydrid unter

Rühren getropft und die Aliquote anschließend für 3 Tage bei RT an der Luft getrocknet. Die weitgehend trockenen Gele werden mit Reinstwasser aufgequollen und mit einer Mischung aus 10 ml konzentrierter Ammoniak-Lösung, 15 ml entionisiertem Wasser und 225 ml Methanol mehrfach gewaschen und dabei deprotoniert. Abschließend werden die resultierenden Gele mehrfach mit entionisiertem Wasser neutral gewaschen und für 7 Tage im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

Die Bestimmung des N-Acetylierungsgrades der Chitosanproben erfolgt gemäß dem Verfahren von BEIL ET AL., 2012(2), bei welchem nach Aufnahme von ATR-FTIR-Spektren der Proben die erhaltenen Spektren zunächst einer Savitzky-Golay-Glättung mit 10 Punkten unterzogen und anschließend deren 1. Ableitung gebildet wird. Aus dem so generierten Derivativspektrum 1. Ordnung werden die Werte bei 1383 cm^{-1} , 1327 cm^{-1} und 1163 cm^{-1} bestimmt und der Quotient $dE_M(1383\text{ cm}^{-1} + 1327\text{ cm}^{-1})/dE_R(1163\text{ cm}^{-1})$ berechnet, aus welchem mittels der in Gl. 7 dargestellten Kalibrierbeziehung der N-Acetylierungsgrad (DA) bestimmt werden kann.

$$\frac{dE_M}{dE_R} = 0,0156 \cdot \text{DA} + 0,4902 \% \quad (\text{Gl. 7})$$

Auf diesem Wege erhält man für Chitosan 1, welches mit 28 μl Essigsäureanhydrid umgesetzt wurde, einen N-Acetylierungsgrad $\text{DA} = (19 \pm 2) \%$, für Chitosan 2, welches mit 53 μl Essigsäureanhydrid umgesetzt wurde, $\text{DA} = (29 \pm 3) \%$ und für Chitosan 3, welches mit 80 μl Essigsäureanhydrid umgesetzt wurde, $\text{DA} = (44 \pm 2) \%$.

3.19 Synthese von kovalent verbundenen Systemen aus Chitosan und Pentagalloylglukose

3.19.1 N-Succinylierung von Chitosan

Die Entwicklung geeigneter Verfahren zur kovalenten Verknüpfung von *lmw* Chitosan und Tanninkomponenten ist Gegenstand der Masterarbeit von B.Sc. P. Körner [Körner, 2015]. Die im Folgenden beschriebenen Protokolle zur N-Succinylierung von Chitosan und der anschließenden Tanninylierung von N-Succinylchitosan entstammen der genannten Arbeit.

Für die N-Succinylierung sind 1,6 g *lmw* Chitosan in 100 ml einer 5 %igen Essigsäure zu lösen, anschließend mit 300 ml Methanol und 4 g festem Bernsteinsäureanhydrid zu versetzen und über Nacht bei RT zu rühren. Durch Zugabe von etwa 50 Vol.-% Diethylether

in Relation zum Reaktionsansatz wird eine Fällung des Reaktionsproduktes induziert. Das Präzipitat wird durch Zentrifugation bei 4000 rpm abgetrennt, mehrfach mit Diethylether gewaschen und an der Luft getrocknet.

3.19.2 Tanninylierung von N-Succinyl-Chitosan

Zum Zweck der Tanninylierung von gemäß Abschnitt 3.19.1 hergestelltem N-Succinylchitosan mit entsprechend Abschnitt 3.13 isolierter 1,2,3,4,6-Pentagalloylglukose (PGG) werden 3 verschiedene Ansätze realisiert, deren Produkte mit TaNSCS 1, TaNSCS 2 und TaNSCS 3 bezeichnet werden.

Für die Präparation von TaNSCS 1 sind 106 mg N-Succinylchitosan (500 μmol) zunächst in 10 ml Reinstwasser unter Zugabe einer äquimolaren Menge an festem Natriumhydroxid zu lösen. Dieser Lösung werden 10 ml einer wässrigen EDC-HCl-Lösung mit einer Konzentration von 9,6 mg/ml (50 $\mu\text{mol}/\text{ml}$), sowie 10 ml einer HOBt-Lösung in Methanol mit einer Konzentration von 6,9 mg/ml (50 $\mu\text{mol}/\text{ml}$) und 470 mg PGG (500 μmol), ebenfalls gelöst in 25 ml Methanol, zugesetzt. Der Reaktionsansatz ist über Nacht bei 0 °C in einem tauenden Eisbad zu rühren und anschließend das Reaktionsprodukt durch Zugabe von 50 ml Essigsäureethylester zu fällen. Das Produkt wird mittels Zentrifugation bei 4000 rpm abgetrennt und mit Essigsäureethylester gewaschen.

Die Präparation von TaNSCS 2 und TaNSCS 3 erfolgt in analoger Weise, jedoch werden im erstgenannten Fall die zugegebenen Volumina an EDC-HCl- und HOBt-Lösung auf jeweils 6 ml und im letztgenannten Fall auf jeweils 2 ml reduziert, wobei die dadurch reduzierten Volumina an Methanol und Wasser im Reaktionsansatz durch äquivalente Menge der reinen Lösemittel auszugleichen sind.

Für die Synthese kommen daher im Fall von TaNSCS 1 100 mol-% EDC und HOBt zum Einsatz, für TaNSCS 2 jeweils 60 mol-% und für TaNSCS 3 je 20 mol-%.

3.20 Dialyseliberationsuntersuchungen an Formulierungen von GnRH-Antagonisten mit Partnermolekülen

3.20.1 Konstruktion der Dialyseliberationsapparatur

Abb. 22 visualisiert den schematischen Aufbau der für die vorliegende Arbeit konstruierten Dialyseliberationsapparatur. Das Grundprinzip des damit realisierten Experimentes beruht auf dem von MAJI, 2008 beschriebenen Verfahren.

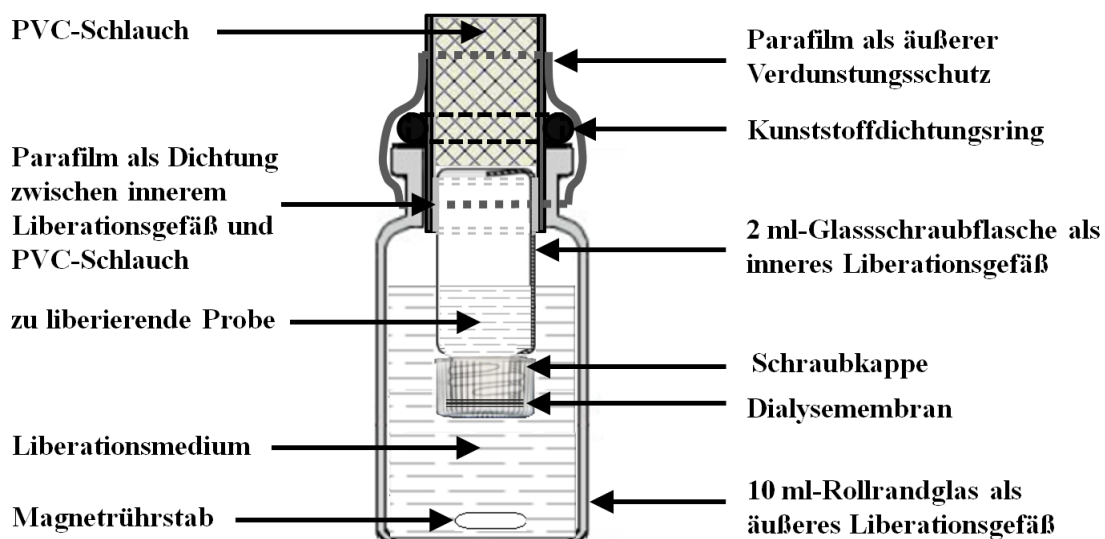


Abb. 22: Schematischer Aufbau der verwendeten Dialyseliberationsapparatur zur Untersuchung des Freisetungsverhaltens von GnRH-Antagonisten-Formulierungen mit biophilen Partnermolekülen

Die Apparatur besteht aus einem inneren Liberationsgefäß, in welchem für jedes Experiment die zu liberierende Formulierung in 1 ml Gesamtvolumen vorgelegt wird, und einem äußeren Liberationsgefäß, welches mit 8 ml des jeweiligen Liberationsmediums gefüllt und während des Experimentes fortwährend unter Nutzung eines 10 mm-Magnetührstabes gleichmäßig durchmischt wird. Salzgehalt und pH-Wert der Lösungen in beiden Gefäßen sind dabei innerhalb einer Probe stets identisch.

Die Liberationsgefäße sind durch eine auf das innere Gefäß aufgeschraubte Dialysemembran aus regenerierter Zellulose mit einem MWCO von 12 - 14 kDa voneinander getrennt, sodass große, amyloide Peptidaggregate im Inneren zurückgehalten werden. Mithilfe einer Konstruktion aus einem Stück PVC-Schlauch, einem Kunststoffdichtungsring und Parafilm wird das innere Liberationsgefäß so positioniert, dass die Flüssigkeitsspiegel in beiden Gefäßen annähernd übereinstimmen. Weiterhin wird durch Umwicklung des oberen Apparaturbereiches mit Parafilm der unkontrollierten Verdunstung des Lösungsmittels zwischen den einzelnen Probenahmen entgegengewirkt.

3.20.2 Probenpräparation

In der vorliegenden Arbeit werden Freisetzungsversuche an Formulierungen von GnRH-Antagonisten in Gegenwart verschiedener Partnermoleküle und in Abhängigkeit von verschiedenen Lösungsparametern, wie etwa Natriumchloridgehalt und pH-Wert,

durchgeführt. Die Probenpräparation erfolgt dabei stets nach dem im Folgenden dargelegten Grundprinzip mit den in Tabelle 21 aufgeführten, für jedes Experiment im Einzelfall angepassten Parametern.

Die Stammlösungen aller Komponenten werden jeweils mit einem pH-Wert von 3,0 hergestellt. Dafür werden je nach Experiment Stammlösungen der GnRH-Antagonisten mit Peptidkonzentrationen von 1 mg/ml bzw. 2 mg/ml aus dem jeweiligen, lyophisierten Acetat des Peptides in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) angesetzt und für 24 h bei RT gerührt. Der Unterschied der beiden Peptidkonzentrationen ist dadurch bedingt, dass die zeitabhängige Konzentrationsbestimmung während des Experimentes für die anfänglichen Untersuchungen fluoreszenzspektroskopisch bzw. mithilfe der in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen HPLC-Anlage realisiert wird, während für den Großteil der durchgeführten Messungen aufgrund verbesserter instrumenteller Möglichkeiten für diese Bestimmung die sensitivere HPLC-Anlage aus Abschnitt 3.2.4 zum Einsatz kommt.

Für alle Polysaccharide, die als Partnermoleküle eingesetzt werden, werden jeweils Stammlösungen zu 2 mg/ml in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) angesetzt und für 24 h bei RT gerührt. Ausnahmen stellen hierbei die beiden polyanionischen Vertreter Hyaluronsäure und Alginsäure dar. In diesen letztgenannten Fällen werden Lösungen zu je 1 mg/ml in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) hergestellt und anschließend durch Zugabe verdünnter Ammoniaklösung bzw. 0,1 M Essigsäure der infolge des Lösevorgangs veränderte pH-Wert wieder auf pH 3,0 eingestellt.

Die Stammlösung der ungetrennten Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* wird mit einer Konzentration von 4 mg/ml in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) angesetzt und der pH-Wert nach dem Lösen mit verdünnter Ammoniaklösung exakt auf pH 3,0 eingestellt. Für alle anderen Tanninfraktionen und -spezies wird die jeweils nach entsprechender Trennung gemäß Abschnitt 3.12 bzw. Abschnitt 3.13 vorliegende Lösung in geeigneter Weise mit Reinstwasser so verdünnt, dass Stammlösungen zu 3 mg GAE/ml resultieren, was mithilfe des in Abschnitt 3.11 erläuterten Verfahrens überprüft wird. Der pH-Wert dieser Lösungen ist entsprechend auf pH 3,0 einzustellen.

Für die Untersuchung nicht-kovalent verbundener Systeme aus Chitosan und der Gallotanninmischung bzw. den gemäß Abschnitt 3.13 gewonnenen, finalen Tanninspezies sind Stammlösungen der drei N-acetalisierten Chitosane mit DA-Werten von 19 %, 29 % bzw. 44 %, welche nach der Vorschrift aus Abschnitt 3.18 präpariert werden, zu je 2 mg/ml in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) und Stammlösungen der Gallotanninmischung und der drei

Tanninspezies 3GG, 4GG und PGG zu je 2 mg GAE/ml in Reinstwasser herzustellen, wobei die Tannin-Stammlösungen anschließend noch auf pH 3,0 einzustellen sind.

Die Untersuchung kovalent verbundener Systeme aus Chitosan und Pentagalloylglukose (PGG) erfolgt unter Verwendung von Stammlösungen zu je 3 mg/ml in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) unter Ultraschallbehandlung. Die drei verwendeten, tanninylierten Chitosan-Derivate wurden durch B.Sc. P. Körner nach der in Abschnitt 3.19 dargestellten Synthesvorschrift generiert und für die hier beschriebenen Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Weiterhin werden für die Experimente zur Evaluierung der entwickelten Dialyseliberationsapparatur Stammlösungen von Tyrosin als niedermolekulare Modellsubstanz mit einer Konzentration von 41,4 $\mu\text{mol/l}$ in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) benötigt.

Für die Herstellung der einzelnen Proben werden die korrespondierenden Stammlösung entsprechend der in Tabelle 21 angegebenen Mengenverhältnisse zunächst in Doppelansätzen bei pH 3,0 zusammengegeben, mit 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) jeweils auf 1 ml Probenvolumen aufgefüllt, gut durchmischt und für 4 h bei RT inkubiert. Anschließend wird durch Zugabe einer vorher anhand einer peptidfreien Referenz titrierten Menge an verdünnter Ammoniaklösung jede Probe auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt und für mindestens weitere 2 h bei RT inkubiert, bevor der Start des Dialyseliberationsexperimentes erfolgt.

Abweichend von diesem Vorgehen wird bei denjenigen Experimenten, die in Gegenwart von 0,9 % Natriumchlorid durchgeführt werden, nach dem Zusammengeben von GnRH-Antagonist und Partnermolekül lediglich auf 900 μl Probenvolumen aufgefüllt, für 4 h bei RT inkubiert und anschließend 100 μl einer 9 %igen Natriumchloridlösung in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) zugegeben, bevor die Neutralisation der Proben erfolgt. Alle weiteren Schritte sind identisch.

Für alle in Tabelle 21 aufgeführten Konstellationen werden immer auch peptidfreie Referenzproben mitgeführt und untersucht.

Tabelle 21: Parameter der im einzelnen durchgeführten Dialyseliberationsexperimente

untersuchte GnRH-Antagonisten/Modellsubstanzen	Gehalt des GnRH-Antagonisten im Ansatz	untersuchte Partnermoleküle/Zusatzstoffe	untersuchte Partnermolekül / GnRH-Antagonist - Massenverhältnisse	untersuchte pH-Werte	verwendete Methode zur Quantifizierung des GnRH-Antagonisten
Tyrosin	6,9 $\mu\text{mol/l}$ 13,8 $\mu\text{mol/l}$ 20,7 $\mu\text{mol/l}$	-	-	3,0	Fluoreszenz-Spektroskopie
Tyrosin	6,9 $\mu\text{mol/l}$ 13,8 $\mu\text{mol/l}$ 20,7 $\mu\text{mol/l}$	<i>lmw</i> Chitosan	Chitosan-konzentration: 1 mg/ml	3,0	Fluoreszenz-Spektroskopie
Cetrorelix	1 mg/ml	-	-	3,0 4,0/5,0 7,0	Fluoreszenz-Spektroskopie

3 Material und Methoden

Cetorelix	1 mg/ml	<i>lmw</i> Chitosan	1 : 1	3,0 5,0 7,0	Fluoreszenz- Spektroskopie
Cetorelix	1 mg/ml	lösliche Stärke, Amylose & Amylopektin	1 : 1	3,0 4,0	Fluoreszenz- Spektroskopie
Cetorelix	1 mg/ml	-	-	4,0 5,0 7,0	HPLC-Anlage 1 (Abschnitt 3.2.3)
Cetorelix	1 mg/ml	+ 0,9 % NaCl	(+ 0,9 % NaCl)	4,0 5,0 7,0	HPLC-Anlage 1 (Abschnitt 3.2.3)
Cetorelix	1 mg/ml	Gallotanninmischung	1 : 1	4,0 5,0 7,0	HPLC-Anlage 1 (Abschnitt 3.2.3)
Cetorelix	1 mg/ml	Gallotanninmischung + 0,9 % NaCl	1 : 1 (+ 0,9 % NaCl)	4,0 5,0 7,0	HPLC-Anlage 1 (Abschnitt 3.2.3)
Cetorelix	0,5 mg/ml	Alginsäure	0,3 : 1 1 : 1 3 : 1	3,0 5,0 7,0	HPLC-Anlage 2 (Abschnitt 3.2.4)
Cetorelix	0,5 mg/ml	Hyaluronsäure	0,3 : 1 1 : 1 3 : 1	3,0 5,0 7,0	HPLC-Anlage 2 (Abschnitt 3.2.4)
Cetorelix*, Ozarelix & Teverelix	0,5 mg/ml	TaF3-Gesamtfraktion TaF3 Peak1 TaF3 Peak2 TaF3 Peak3	0,3 : 1 1 : 1 3 : 1	3,0 5,0 7,0	HPLC-Anlage 2 (Abschnitt 3.2.4)
Cetorelix & Ozarelix	0,5 mg/ml	TaF4-Gesamtfraktion TaF4 Peak1 TaF4 Peak2 TaF4 Peak3	0,3 : 1 1 : 1 3 : 1	3,0 5,0 7,0	HPLC-Anlage 2 (Abschnitt 3.2.4)
Cetorelix, Ozarelix & Teverelix	0,5 mg/ml	3GG 4GG PGG	0,3 : 1 1 : 1 3 : 1	3,0 5,0 7,0	HPLC-Anlage 2 (Abschnitt 3.2.4)
Cetorelix	0,5 mg/ml	Chitosan1 (DA=19%) Chitosan2 (DA=29%) Chitosan3 (DA=44%)	1 : 1	3,0 5,0 7,0	HPLC-Anlage 2 (Abschnitt 3.2.4)
Cetorelix	0,5 mg/ml	nicht-kovalente Systeme aus der Gallotanninmischung und Chitosan1 (DA=19%) Chitosan2 (DA=29%) Chitosan3 (DA=44%)	1 : 1 : 1	3,0 5,0 7,0	HPLC-Anlage 2 (Abschnitt 3.2.4)
Cetorelix	0,5 mg/ml	nicht-kovalente Systeme aus 3GG, 4GG bzw. PGG und Chitosan1 (DA=19%) Chitosan2 (DA=29%) Chitosan3 (DA=44%)	1 : 1 : 1	3,0 5,0 7,0	HPLC-Anlage 2 (Abschnitt 3.2.4)
Cetorelix	0,5 mg/ml	kovalent verbundene Systeme aus PGG und <i>lmw</i> Chitosan TaNSCS 1 TaNSCS 2 TaNSCS 3	0,3 : 1 1 : 1 3 : 1	3,0 5,0 7,0	HPLC-Anlage 2 (Abschnitt 3.2.4)

* Die dargestellten Ergebnisse zur Dialyseliberation von Cetorelix-Formulierungen mit der Gesamtfraktion und Teilfraktionen der Tanninfraktion TaF3 entstammen der Bachelorarbeit von B.Sc. C. Grundmann [Grundmann, 2014]

3.20.3 Durchführung der Messungen

Die unter Befolgung der Vorschrift aus Abschnitt 3.20.2 hergestellten Proben sind in das innere Liberationsgefäß zu überführen, mit einem ca. 10 x 10 mm großen, faltenfreien Dialysemembranteilstück abzudecken und mit dem Schraubdeckel des Gefäßes fest zu verschließen. Die Dialysemembran ist in Vorbereitung des Experimentes 2 h in siedendem, entionisiertem Wasser zwecks Desinfektion zu kochen und anschließend darin, in einem luftdicht verschlossenen Gefäß für mindestens 72 h zum Quellen zu lagern.

Das auf diesem Weg verschlossene, innere Liberationsgefäß wird um 180° gedreht und durch Schütteln von möglichen Luftblasen auf der Innenseite der Membran befreit. Gleichzeitig ist die Dichtheit des verschraubten Gefäßes in Augenschein zu nehmen. Das Gefäß wird, wie in Abb. 22 dargestellt, in das äußere Liberationsgefäß eingesetzt, welches 8 ml des Liberationsmediums enthält. Das Liberationsmedium entspricht jeweils einer 0,1 M Essigsäure bzw. einer wässrigen 0,1 M Ammoniumacetat-Lösung, die mit der Probe in Bezug auf pH-Wert und Natriumchloridgehalt übereinstimmt.

Die Apparatur wird mit Parafilm als Verdunstungsschutz umwickelt und bei 750 rpm gleichmäßig über den gesamten Liberationszeitraum von in der Regel 28 Tagen bei RT gerührt. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine stetige Optimierung mit dem Ziel der Entwicklung einer standardisierten Methode mit möglichst hoher Aussagekraft bei gleichzeitig möglichst geringem Einsatz an GnRH-Antagonisten vorgenommen wurde, variieren die Folgeschritte zwischen den verschiedenen Experimenten im Detail.

Für die in Tabelle 21 aufgeführten Experimente, für welche die Bestimmung der Konzentration des GnRH-Antagonisten im äußeren Liberationsgefäß mittels Fluoreszenzspektroskopie bewerkstelligt wird, müssen zu jedem Messpunkt Aliquote zu 400 µl für die Bestimmung entnommen werden. Für die Untersuchungen an Tyrosinlösungen werden solche Proben nach 30 min, 1 h, 3 h, 5 h, 7 h, 24 h, 48 h, 5 d und 7 d genommen. Für die entsprechenden Versuche mit Cetrorelix-haltigen Proben erfolgt zusätzlich eine Probenahme nach 14 d, 21 d und 28 d. Die entnommenen Probevolumina werden durch Zugabe von 400 µl des entsprechenden Liberationsmediums in der Apparatur wieder ausgeglichen.

Zur Durchführung der in Tabelle 21 dargestellten Versuche, bei denen die Quantifizierung des GnRH-Antagonisten im Verlauf der Liberation mithilfe der HPLC-Anlage 1 aus Abschnitt 3.2.3 vorgenommen wird, sind lediglich 100 µl-Aliquote nach 2 h, 24 h, 48 h, 5 d, 7 d, 14 d, 21 d und 28 d zu entnehmen und durch Zugabe des gleichen Volumens an Liberationsmedium in der Apparatur stets zu ersetzen.

Für die optimierte Durchführungsvariante unter Verwendung der HPLC-Anlage 2 aus Abschnitt 3.2.4 für die Bestimmung der zeitabhängig freigesetzten GnRH-Antagonisten-Menge werden jeweils nach 24 h, 1 d, 7 d, 14 d, 21 d und 28 d Aliquote von 200 µl aus dem äußeren Liberationsgefäß entnommen und für die weiterführende Analytik mittels HPLC verwendet. Das entnommene Probenvolumen wird auch in diesem Fall durch Zugabe von 200 µl einer entsprechenden 0,1 M Essigsäure bzw. 0,1 M Ammoniumacetat-Lösung nach jeder Probenahme ausgeglichen und die Apparatur anschließend wieder mit Parafilm umwickelt. Es ist dabei stets darauf zu achten, dass die Membran beidseitig frei von Luftblasen bleibt. Zum Abschluss des Experimentes wird zusätzlich eine Probe aus dem inneren Liberationsgefäß genommen, indem nach Entfernung der Membran die verbliebene Probe auf 2 ml mit 99 %igem, vergällten Ethanol aufgefüllt, gut durchmischt und daraus ebenfalls 200 µl zur weiteren Untersuchung entnommen werden.

Aus den 200 µl-Aliquoten wird in jedem Fall die Quantifizierung des GnRH-Antagonisten realisiert, im Falle tanninhaltiger Ansätze jedoch noch zusätzlich eine Untersuchung der freigesetzten Tanninkomponenten unter Nutzung eines weiteren HPLC-Verfahrens.

Für alle durchgeführten Dialyseliberations-Experimente können die zeitabhängigen Messwerte der Anhang-DVD unter "Dialyseliberation" entnommen werden.

3.20.4 Fluoreszenzspektroskopische Quantifizierung der zeitabhängigen Freisetzung von GnRH-Antagonisten

Die an jedem Messpunkt entnommenen 400 µl-Aliquote werden je nach pH-Wert des Liberationsmediums durch Zugabe von 100 µl einer entsprechend verdünnten Essigsäure-Lösung auf pH 3,0 eingestellt und in eine 10 x 4 mm Quarzküvette überführt. Die Fluoreszenzmessung erfolgt mit einer Anregungswellenlänge von 280 nm bei einer Emissionswellenlänge von 334 nm mit einer Photomultiplier-Spannung von 700 V, Spaltbreiten von jeweils 5 nm und einer Scangeschwindigkeit von 60 nm/min.

Unter diesen Bedingungen weist eine in analoger Weise behandelte Cetrorelix-Referenzprobe von der bei maximaler Freisetzung erreichbaren Peptidkonzentration von 0,111 mg/ml in dem noch zu verdünnenden 400 µl-Aliquot eine Fluoreszenzemissionsintensität von 889 f.u. auf. Die gemessenen Werte der zeitabhängigen Proben werden daher relativ zu der genannten Intensität als Maß für die prozentuale Freisetzung des Peptides betrachtet.

3.20.5 HPLC-basierte Quantifizierung der zeitabhängigen Freisetzung von GnRH-Antagonisten

Die HPLC-basierte Bestimmung der freigesetzten GnRH-Antagonisten-Menge erfolgt entsprechend der verwendeten HPLC-Anlage gemäß Abschnitt 3.3. In diesem Fall muss in Abhängigkeit von der für das Experiment eingesetzten Peptidmenge von 0,5 mg bzw. 1,0 mg, nach Gleichverteilung in 9 ml Gesamtvolumen von 0,0556 mg/ml bzw. 0,111 mg/ml maximaler Peptidkonzentration für die Berechnung der prozentualen Freisetzung ausgegangen werden.

3.20.6 HPLC-basierte Untersuchung der zeitabhängigen Freisetzung von Tanninspezies

Die HPLC-basierte Untersuchung der zeitabhängig freigesetzten Tanninkomponenten wird unter Verwendung der in Abschnitt 3.15 besprochenen HPLC-Verfahren ermöglicht. Für Untersuchungen an Gesamt- und Teilfraktionen der Tanninfraktionen TaF3 und TaF4 dienen die speziell für diese Tanninfraktionen optimierten HPLC-Programme, wohingegen in allen anderen Fällen unisono das für Methanolyse-Proben optimierte Programm zum Einsatz kommt.

4 Ergebnisse

4.1 Die Aggregation von GnRH-Antagonisten

4.1.1 Sekundärstrukturanalyse mithilfe der ATR-FTIR-Spektroskopie

4.1.1.1 Sekundärstrukturverteilung in Aggregaten von Cetrorelix und einigen N-terminalen Fragmenten dieses GnRH-Antagonisten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird die Verteilung von Sekundärstrukturelementen in Aggregaten von GnRH-Antagonisten sowie in Aggregaten einiger ihrer Fragmente und eines Syntheseintermediates mithilfe der ATR-FTIR-Spektroskopie untersucht. Die Sekundärstrukturanalyse erfolgt dabei gemäß Abschnitt 3.4.4 basierend auf einer mathematischen Zerlegung der infrarotspektroskopisch bestimmten Amid I-Bande in eine Summe von Gaußfunktionen.

Eine wesentliche Voraussetzung für diese Studien besteht in dem im Folgenden beschriebenen, für alle Peptide beobachteten Aggregations- und Fällungsverhalten bei einem pH-Sprung von 3,0 auf 7,0. Selbst das nur 4 Aminosäurereste umfassende, N-terminale Cetrorelix-Fragment Cx[1-4] präzipitiert makroskopisch sichtbar bei einem solchen, durch Zugabe verdünnter Ammoniaklösung hervorgerufenen pH-Sprung. Die Sekundärstrukturanalyse kann daher für alle Peptide an den so erhaltenen Präzipitaten vorgenommen werden.

In Abb. 23 ist das Ergebnis der Bandenzerlegung im Fall der Amid I-Bande des aggregierten Cetrorelix-Fragmentes Cx[1-4] graphisch veranschaulicht.

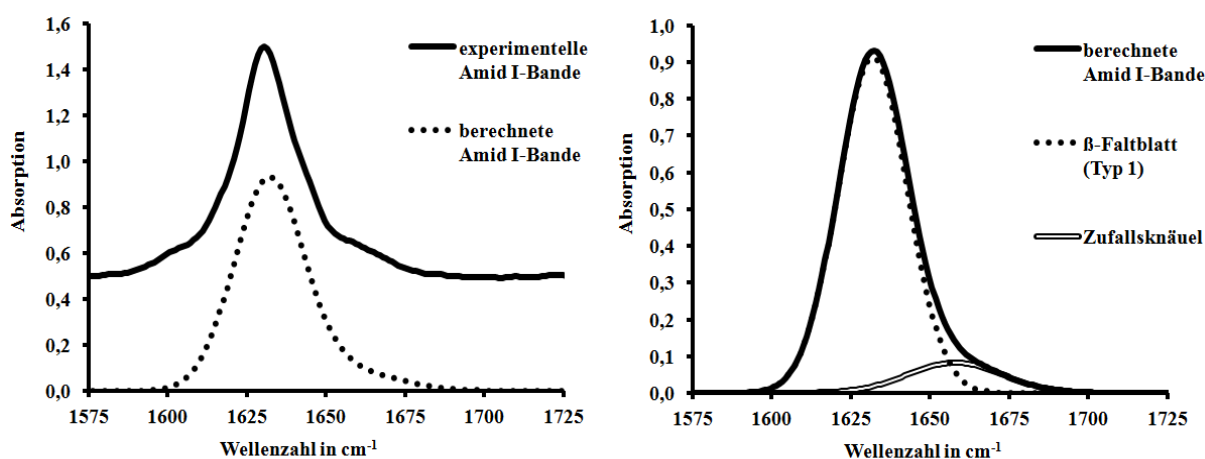


Abb. 23: Bandenformanalyse der Amid I-Bande des Cetrorelix-Fragmentes Cx[1-4]; links: Gegenüberstellung von experimentell bestimmter und berechneter Amid I-Bande; rechts: Darstellung der einzelnen sekundärstrukturspezifischen Gaußfunktionen

Im linken Teil der Abbildung ist die experimentell bestimmte Bandenform der mathematisch berechneten gegenüber gestellt. Dabei ist deutlich zu sehen, dass die Amid I-Bande im vorliegenden Fall hochsymmetrisch und äußerst scharf ausfällt, was im rechten Teil von Abb. 23 dadurch unterstrichen wird, dass sich die gesamte Bandenform annähernd durch eine einzige dominante Gaußfunktion beschreiben lässt. Das Maximum dieser Bande bei 1632 cm^{-1} und die geringe Halbwertsbreite lassen eine eindeutige Zuordnung dieser Bandenform zu einer β -Faltblattstruktur zu. Daneben ist zur vollständigen Beschreibung eine weitere Gaußfunktion mit deutlich größerer Halbwertsbreite und einem Maximum bei 1658 cm^{-1} notwendig, die sich einem Zufallsknäuel-Typ zuordnen lässt, jedoch in diesem Fall nur zu einem sehr geringen Anteil an der Gesamtstruktur beteiligt ist.

Daraus ergibt sich die Erkenntnis, dass die beobachtete Aggregation des Cetrarelix-Fragmentes Cx[1-4] unter fast ausschließlicher Bildung von β -Faltblattstrukturen verläuft und daher einem amyloiden Aggregationsverhalten entspricht.

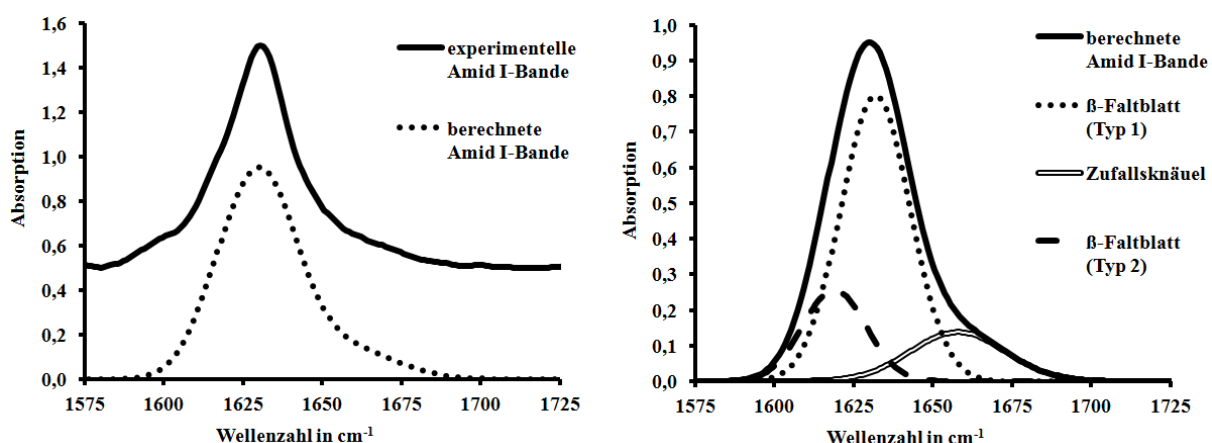


Abb. 24: Bandenformanalyse der Amid I-Bande des Cetrarelix-Fragmentes Cx[1-6]; links: Gegenüberstellung von experimentell bestimmter und berechneter Amid I-Bande; rechts: Darstellung der einzelnen sekundärstrukturspezifischen Gaußfunktionen

Die Analyse des nächst größeren, verfügbaren Cetrarelix-Fragmentes Cx[1-6] liefert die in Abb. 24 visualisierte Bandenzerlegung. In diesem Fall ist die experimentell bestimmte Amid I-Bande bei weitem nicht so symmetrisch wie die entsprechende Bande des Cetrarelix-Fragmentes Cx[1-4], sondern weist eine kleine Schulter auf Seiten der niedrigeren Wellenzahlen auf. Dieser Asymmetrie muss in der mathematischen Beschreibung der Bandenform durch Einführung einer weiteren Gaußfunktion Rechnung getragen werden. Dabei entspricht die neu eingeführte Bande mit einem Maximum bei 1619 cm^{-1} und einer ebenfalls geringen Halbwertsbreite erneut dem Charakteristikum einer β -Faltblattstruktur,

welche sich jedoch aufgrund der beachtlichen Diskrepanz der Wellenzahl am jeweiligen Maximum von der dominant auftretenden β -Faltblattstruktur des im Kontext mit dem Cetrorelix-Fragment Cx[1-4] diskutierten Typs klar unterscheiden lässt. Zur Unterscheidung wird daher im Folgenden die β -Faltblattstruktur, deren Amid I-Teilbande ein Maximum von 1632 cm^{-1} aufweist, als "Typ 1" und die β -Faltblattstruktur, deren Teilbande ein Maximum bei 1619 cm^{-1} besitzt, als "Typ 2" bezeichnet.

Abb. 25 stellt die Bandenzerlegung für das präzipitierte Aggregat des Cetrorelix-Fragmentes Cx[1-9] dar. Bei Betrachtung der experimentellen Bandenform fallen zwei Aspekte sofort ins Auge. Zum einen ist die in Abb. 24 nur leicht erkennbare Asymmetrie infolge einer Schulter bei niedrigeren Wellenzahlen in Abb. 25 so intensiv, dass die gesamte Amid I-Bande sehr viel breiter erscheint. Allein bei näherer Analyse des Wellenzahlbereiches in unmittelbarer Nähe zum Bandenmaximum wird deutlich, dass es sich hierbei um eine Überlagerung mehrerer schmaler Banden anstelle einer breiten Bande handeln muss. Im rechten Teil von Abb. 25 ist erkennbar, dass dieser Effekt durch eine relative Zunahme des Beitrages der β -Faltblatt-Struktur des Typs 2 zustande kommt.

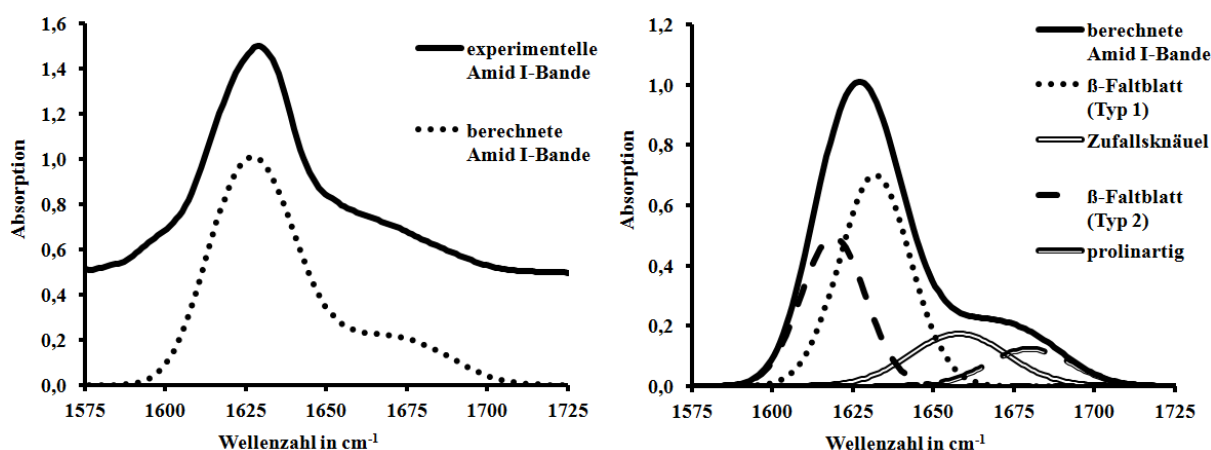


Abb. 25: Bandenformanalyse der Amid I-Bande des Cetrorelix-Fragmentes Cx[1-9]; links: Gegenüberstellung von experimentell bestimmter und berechneter Amid I-Bande; rechts: Darstellung der einzelnen sekundärstrukturspezifischen Gaußfunktionen

Desweiteren zeigt sich hier erstmals ein bedeutender Absorptionsbeitrag bei Wellenzahlen oberhalb von 1670 cm^{-1} . Dieser hohe Wellenzahlbereich erfordert erneut die Einführung einer zusätzlichen Gaußfunktion mit einem Maximum bei 1680 cm^{-1} und einer relativ hohen Halbwertsbreite. Diese Bandenlage wird typischerweise mit stark gebogenen Peptidrückgratstrukturen assoziiert, wie sie im Bereich von β -Turn-Strukturen vorkommen. Da sie innerhalb der hier vorliegenden, kurzen Peptidsequenz jedoch bezogen auf die Intensität der

entsprechenden Teilbande nur eine Peptidbindung umfassen kann, erscheint es plausibel, diese mit der besonderen, *trans*-konfigurierten Peptidbindung des Pro⁹-Restes in Verbindung zu bringen.

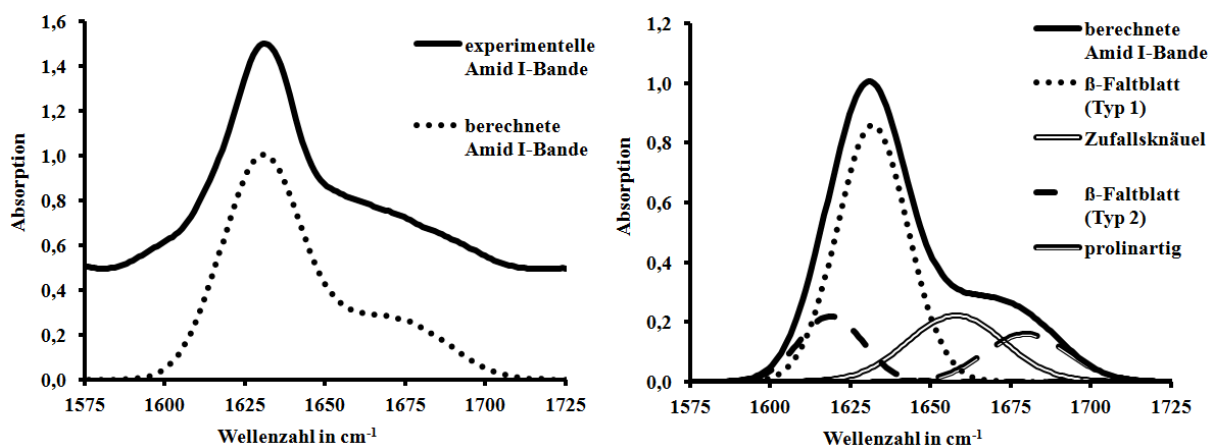


Abb. 26: Bandenformanalyse der Amid I-Bande des vollständigen Cetorelix-Dekapeptides; links: Gegenüberstellung von experimentell bestimmter und berechneter Amid I-Bande; rechts: Darstellung der einzelnen sekundärstrukturspezifischen Gaußfunktionen

Die resultierende Bandenzerlegung für das Aggregat des vollständigen Dekapeptides Cetorelix ist in Abb. 26 gezeigt. Die Ergebnisse ähneln dabei erwartungsgemäß recht stark den Resultaten für das Cetorelix-Fragment Cx[1-9], welches nur um den C-terminalen D-Ala-NH₂¹⁰-Rest gegenüber dem kompletten Dekapeptid verkürzt ist. Allerdings tritt bei etwa identischen Beiträgen durch Zufallsknäuel und prolinartige Strukturen eine markante relative Verschiebung zwischen den Beiträgen der beiden β -Faltblattstrukturen zugunsten der Typ 1-Variante zu Tage.

Die aus den Flächenverhältnissen der erläuterten Teilbanden berechneten Sekundärstrukturverteilungen sind in Abb. 27 für alle Cetorelix-Fragmente zusammengefasst. Dabei ist die prozentuale Verteilung für jedes Peptid auf die im speziellen Fall vorhandene Anzahl an Peptidbindungen skaliert dargestellt, um eine intuitive Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Diesbezüglich wird die erste Amidbindung zwischen der N-terminalen Acetylgruppe und der Aminogruppe von Ac-D-Nal(2)¹ mitgezählt, da sie sich infrarotspektroskopisch und in wesentlichen sekundärstrukturelevanten Aspekten wie eine Peptidbindung verhält.

Aus Abb. 27 ist ersichtlich, dass die β -Faltblattstruktur des Typs 1 in den Cetorelix-Fragmenten Cx[1-4], Cx[1-6] und Cx[1-9] die konstante Anzahl von etwa 4 Peptidbindungen umfasst, während die β -Faltblattstruktur des Typs 2 ausschließlich in Peptiden nachweisbar ist, deren Sequenz C-terminal über Tyr⁵ hinausgeht. Der Gesamt- β -Faltblatt-Gehalt verändert

sich beim Übergang von Cx[1-9] zum kompletten, aggregierten Dekapeptid nicht. Lediglich die relative Verteilung zwischen Strukturtyp 1 und 2 wird verschoben.

Die mit "Cetorelix*" gekennzeichnete Probe in Abb. 27 korreliert mit einem direkt nach der Synthese bei sehr niedrigem pH-Wert lyophilisierten Cetorelix-Dekapeptid. Dieses ist weitgehend ungeordnet und weist nur einen geringen β -Faltblatt-Gehalt auf.

Die als "prolinartig" beschriebene Teilbande tritt konsequent nur in Peptiden auf, die über den Rest Pro⁹ C-terminal hinausgehen, und umfasst stets eine einzelne Peptidbindung, was die getroffene Zuordnung stützt.

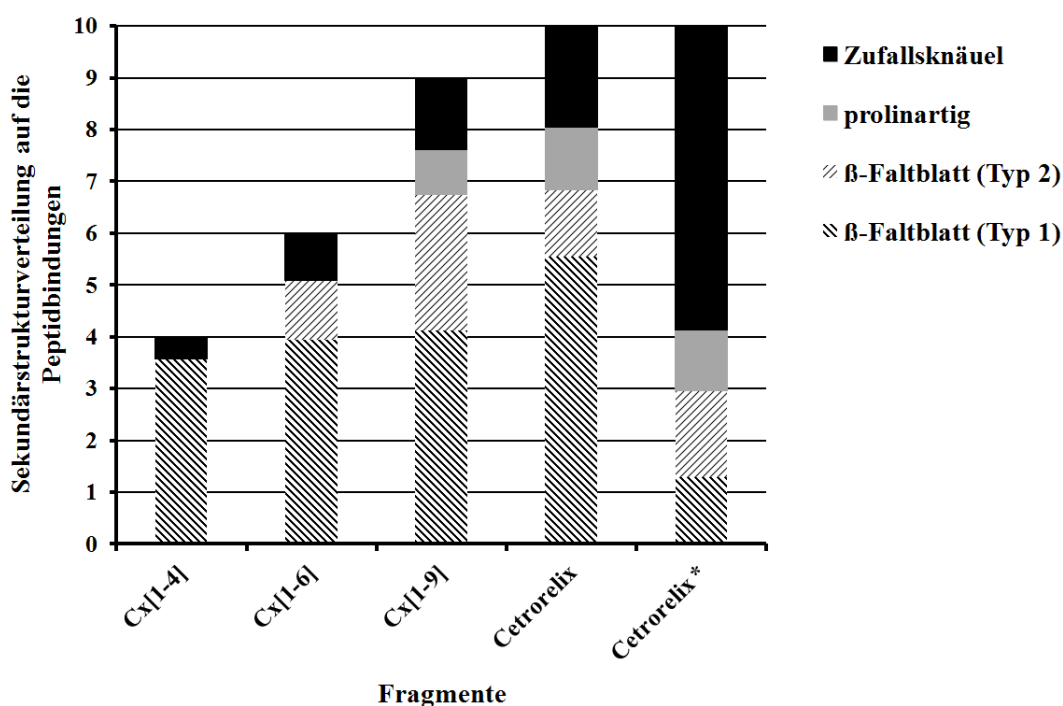


Abb. 27: Quantitative Auswertung der Bandenformanalyse der Amid I-Bande von Aggregaten der Cetorelix-Fragmente Cx[1-4], Cx[1-6] und Cx[1-9], sowie des aggregierten und des bei niedrigem pH-Wert ungeordnet lyophilisierten Cetorelix-Dekapeptides (ungeordnetes Dekapeptid mit * gekennzeichnet)

4.1.1.2 Sekundärstrukturverteilung in Aggregaten von Ozarelix, Teverelix und einem Di-*Tertbutyl*-geschützten Syntheseintermediat von Cetorelix

Um die Verallgemeinerungsfähigkeit der anhand von Cetorelix und seinen N-terminalen Fragmenten gewonnenen Erkenntnisse prüfen zu können, werden in analoger Weise Aggregate der beiden strukturverwandten GnRH-Antagonisten Teverelix und Ozarelix, sowie eines an den OH-Gruppen von Ser⁴ und Tyr⁵ Di-*Tertbutyl*-geschützten Syntheseintermediates präzipitiert und untersucht.

Abb. 28 verdeutlicht anhand der ATR-FTIR-Spektren von in beschriebener Weise aggregiert gefälltem Teverelix und bei niedrigem pH-Wert direkt nach der Peptidsynthese ungeordnet lyophilisiertem Teverelix die charakteristische Bandenformveränderung der Amid I-Bande. Dabei ist der im Zuge der Aggregation auftretende Übergang von einer breiten zu einer äußerst scharfen Bande deutlich zu sehen, der auch in diesem Fall eine amyloid-typische Aggregation indiziert.

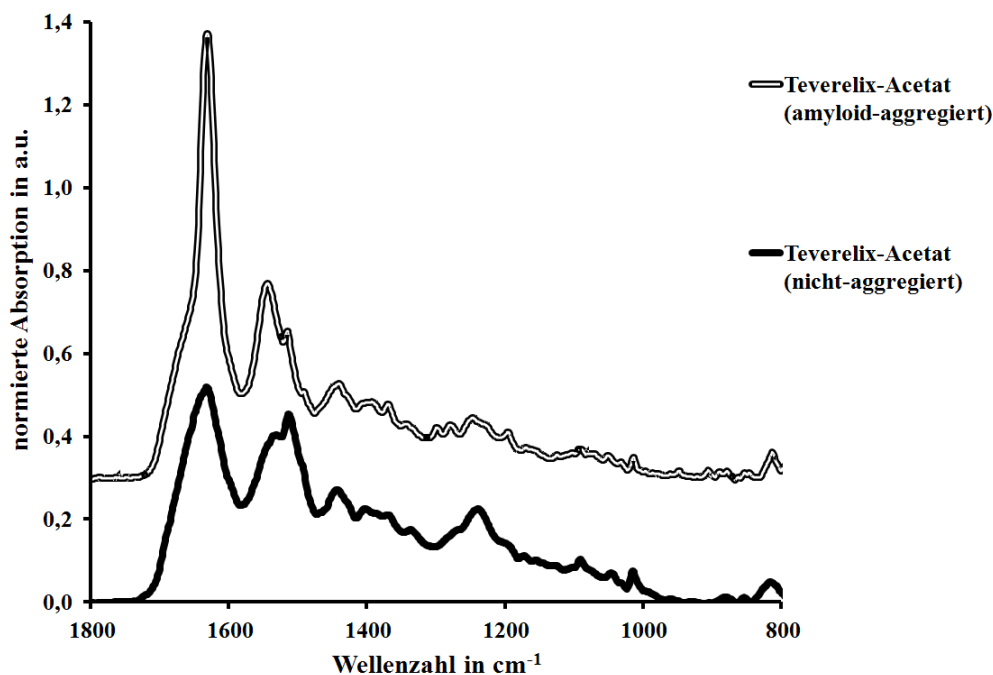


Abb. 28: ATR-FTIR-Spektren von amyloid-aggregiertem und bei niedrigem pH-Wert ungeordnet lyophilisiertem Teverelix-Acetat

Die mathematische Beschreibung der Amid I-Bande von Teverelix-Aggregaten kann mit denselben Gaußfunktionen realisiert werden, welche auch im Falle von Cetrorelix Anwendung finden. Die resultierende Bandenzerlegung ist in Abb. 29 dargestellt. Im Vergleich zu Abb. 26 fällt spontan auf, dass der Beitrag der β -Faltblattstruktur des Typs 2 in diesem Fall deutlich größer ist als für Cetrorelix, was die zugrundeliegende Struktur stärker mit dem Cetrorelix-Fragment Cx[1-9] als mit dem kompletten Cetrorelix-Dekapeptid in eine Reihe stellt. Ein detailliertes Verständnis dieses Phänomens wird erst durch die noch darzustellenden NMR-spektroskopischen Befunde ermöglicht.

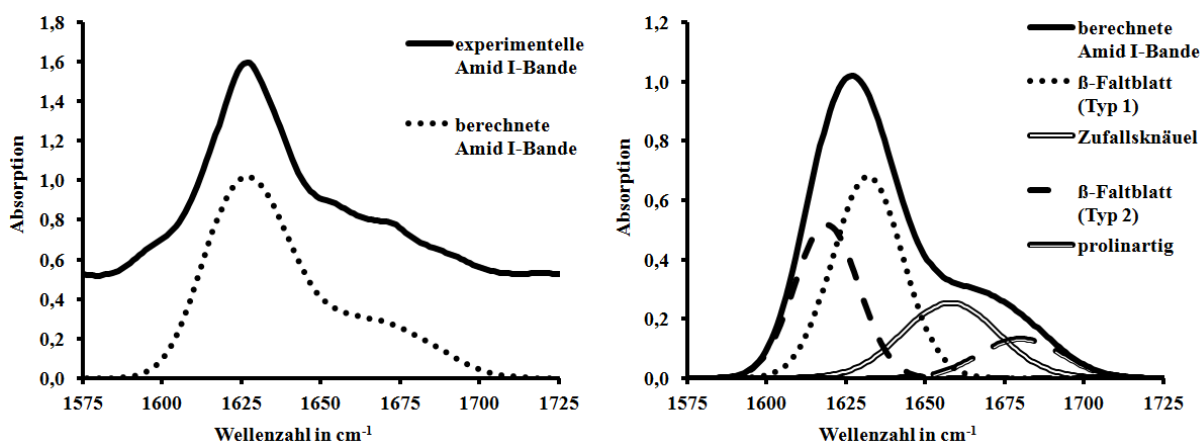


Abb. 29: Bandenformanalyse der Amid I-Bande des vollständigen Teverelix-Dekapeptides; links: Gegenüberstellung von experimentell bestimmter und berechneter Amid I-Bande; rechts: Darstellung der einzelnen sekundärstrukturspezifischen Gaußfunktionen

Für Ozarelix wird demgegenüber eine in bestimmten Aspekten gravierend abweichende Bandenform detektiert, die eine erhebliche Anpassung der Gaußfunktionen erforderlich macht. Die entsprechenden Ergebnisse der Bandenformanalyse sind Abb. 30 zu entnehmen. Es ist bereits mit bloßem Auge zu erkennen, dass im Vergleich zu Cetrorelix und Teverelix die einem Zufallsknäuel zuzuordnenden Anteile der Amid I-Bande im Fall des Ozarelix stärker hervor- und im Gegenzug die β -Faltblatt-Anteile etwas zurücktreten.

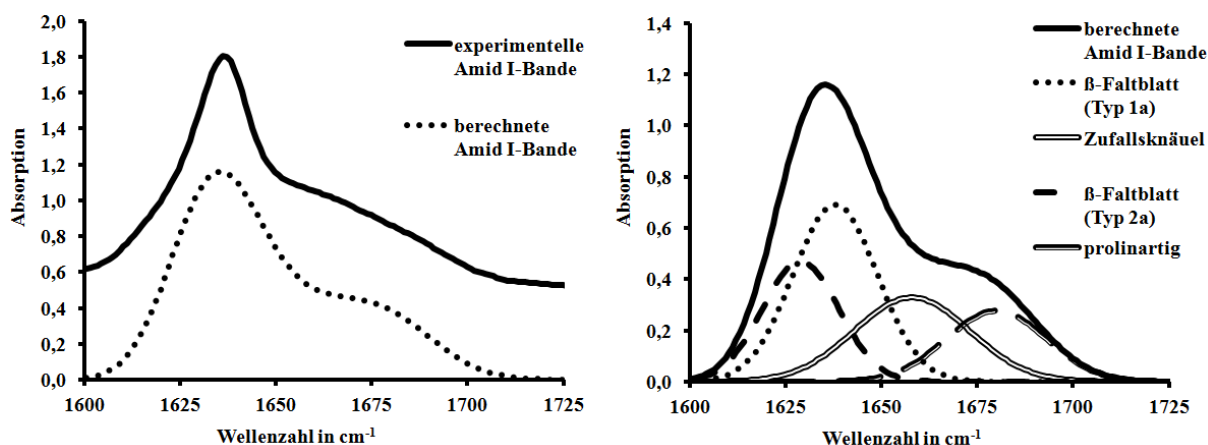


Abb. 30: Bandenformanalyse der Amid I-Bande des vollständigen Ozarelix-Dekapeptides; links: Gegenüberstellung von experimentell bestimmter und berechneter Amid I-Bande; rechts: Darstellung der einzelnen sekundärstrukturspezifischen Gaußfunktionen

Grundsätzlich wird jedoch auch diese Aggregatstruktur von zwei verschiedenen Typen von β -Faltblatt-Strukturen dominiert, die gleichsam in einem Verhältnis zueinander auftreten, welches dem in Abb. 29 dargestellten Verhalten von Teverelix ähnelt. Eine nähere Analyse

zeigt hingegen, dass die Maxima der korrespondierenden Teilbanden für Ozarelix-Aggregate bei 1638 cm^{-1} bzw. 1629 cm^{-1} liegen, was gegenüber Cetrorelix bzw. Teverelix eine Verschiebung um 6 cm^{-1} bzw. um 10 cm^{-1} bedeutet und damit einen signifikanten, energetischen Unterschied aufdeckt. Diesem Unterschied wird Rechnung getragen, indem die hierbei auftretenden β -Faltblatt-Strukturen eigenständig als "Typ 1a" und "Typ 2a" bezeichnet werden.

Bemerkenswerterweise wird im Fall des Di-*Tertbutyl*-geschützten Cetrorelix-Derivates ein annähernd deckungsgleiches Aggregatspektrum im Vergleich zu Ozarelix erhalten, was folglich auch zu einer analogen Bandenzerlegung unter Nutzung der β -Faltblatt-Strukturtypen 1a und 2a führt. Wohingegen die sich hierin äußernde, veränderte Rückgratstruktur aufgrund der vorliegenden Rückgratmethylierung des Restes Tyr(Me)⁵ im Fall von Ozarelix noch durchaus plausibel erscheint, ist der Einfluss der ausschließlich an den Seitenketten angebrachten Schutzgruppen nicht ohne weiteres verständlich und kann nur durch Zuhilfenahme anderer Ergebnisse geklärt werden.

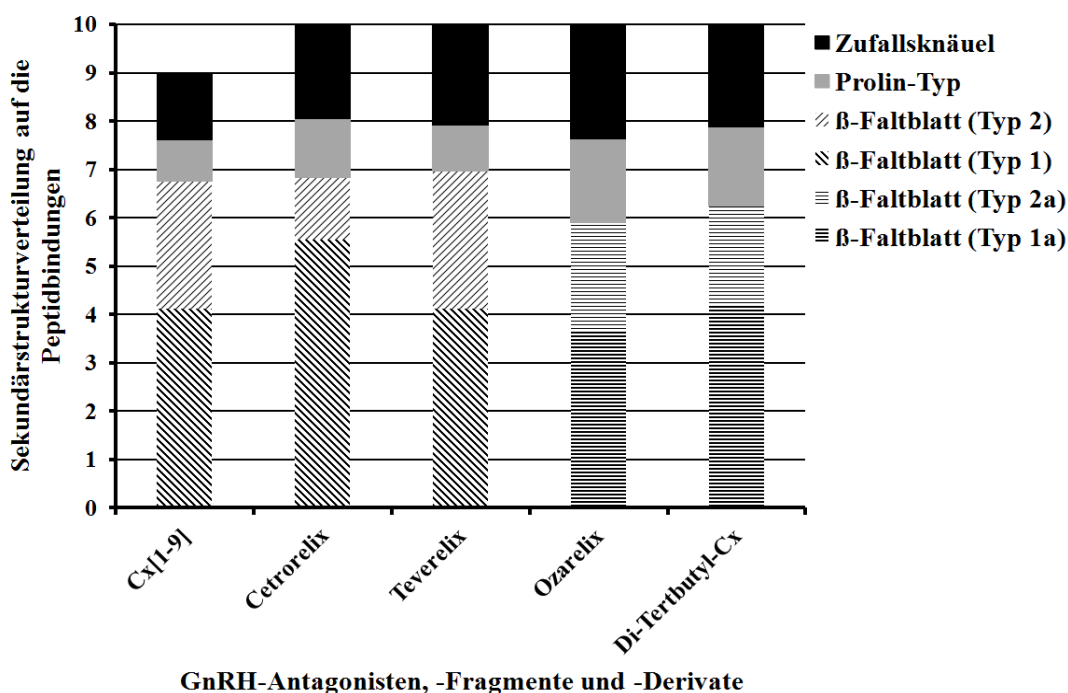


Abb. 31: Quantitative Auswertung der Bandenformanalyse der Amid I-Bande von Aggregaten der GnRH-Antagonisten Cetrorelix, Teverelix und Ozarelix, sowie des Cetrorelix-Fragmentes Cx[1-9] und des Di-*Tertbutyl*-geschützten Cetrorelix-Derivates DG-420099

Abb. 31 gibt eine Übersicht der quantitativen Verteilung der einzelnen Sekundärstrukturelemente für die besprochenen Peptide. Es ist daraus eindeutig ersichtlich, dass Teverelix in etwa der Struktur von Cetrorelix, jedoch mit der relativen Verteilung der β -Faltblatt-Struktur-

Typen zueinander gemäß dem Cetorelix-Fragment Cx[1-9] entspricht. Für Ozarelix und das Di-*Tertbutyl*-geschützte Cetorelix-Derivat ist der β -Faltblatt-Gehalt jeweils äquivalent zu einer Peptidbindung gegenüber Cetorelix und Teverelix verringert. Wie beschrieben weichen in diesen Fällen die Bandenlagen und korrespondierend die β -Faltblatt-Strukturtypen von den anderen beiden GnRH-Antagonisten ab, jedoch erscheint die Relation der jeweils unterscheidbaren β -Faltblatt-Strukturen zueinander recht ähnlich im Vergleich zu Teverelix.

4.1.1.3 Veränderungen der Sekundärstrukturverteilung von GnRH-Antagonisten in Abhängigkeit von Inkubationszeit und pH-Wert

Um das in Abschnitt 4.1.1.1 beschriebene, pH-Wert-abhängige Aggregations- und Fällungsverhalten von GnRH-Antagonisten unter dem Aspekt möglicherweise assoziierter Sekundärstrukturveränderungen genauer zu untersuchen, werden entsprechend der in Abschnitt 3.4.2 ausgeführten Vorgehensweise behandelte Proben der drei vollständigen Dekapeptide Cetorelix, Ozarelix und Teverelix nach entsprechender Inkubation lyophilisiert und mittels ATR-FTIR-Spektroskopie analysiert.

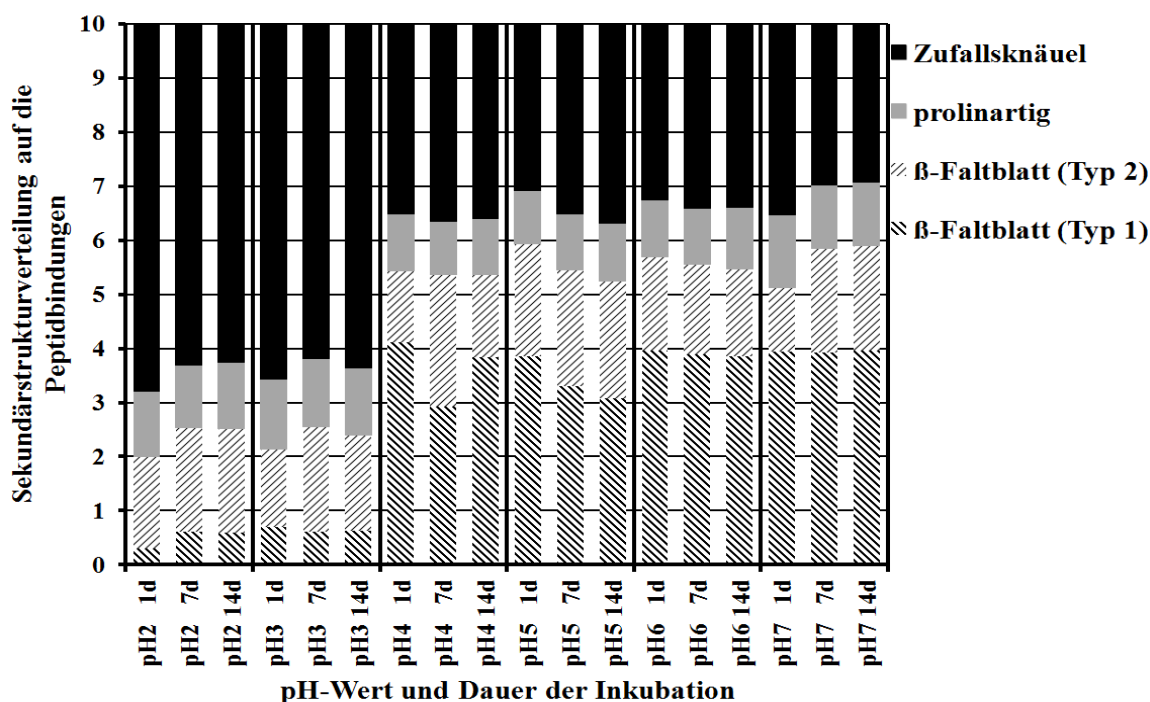


Abb. 32: Sekundärstrukturverteilung von Cetorelix-Proben in Abhängigkeit vom pH-Wert während der Inkubation und von der Inkubationsdauer

Die dabei bestimmten Sekundärstrukturverteilungen sind für Cetorelix in Abb. 32 abgebildet. Bei Betrachtung dieser Messergebnisse wird deutlich, dass es einen Sprung im Verhalten zwischen pH 3,0 und pH 4,0 gibt. Während für pH-Werte oberhalb dieses Sprungpunktes die

amyloid-typischen hohen β -Faltblattanteile detektiert werden, dominiert bei niedrigeren pH-Werten eine ungeordnete Zufallsknäuelstruktur. Diese Veränderung steht damit in direkter Übereinstimmung zum beobachteten, makroskopischen Präzipitationsverhalten und kann daher eindeutig mit der Ausbildung der Aggregatstruktur in Verbindung gesetzt werden. Eine ausgeprägte Zeitabhängigkeit zeigt sich in Abb. 32 allerdings nicht.

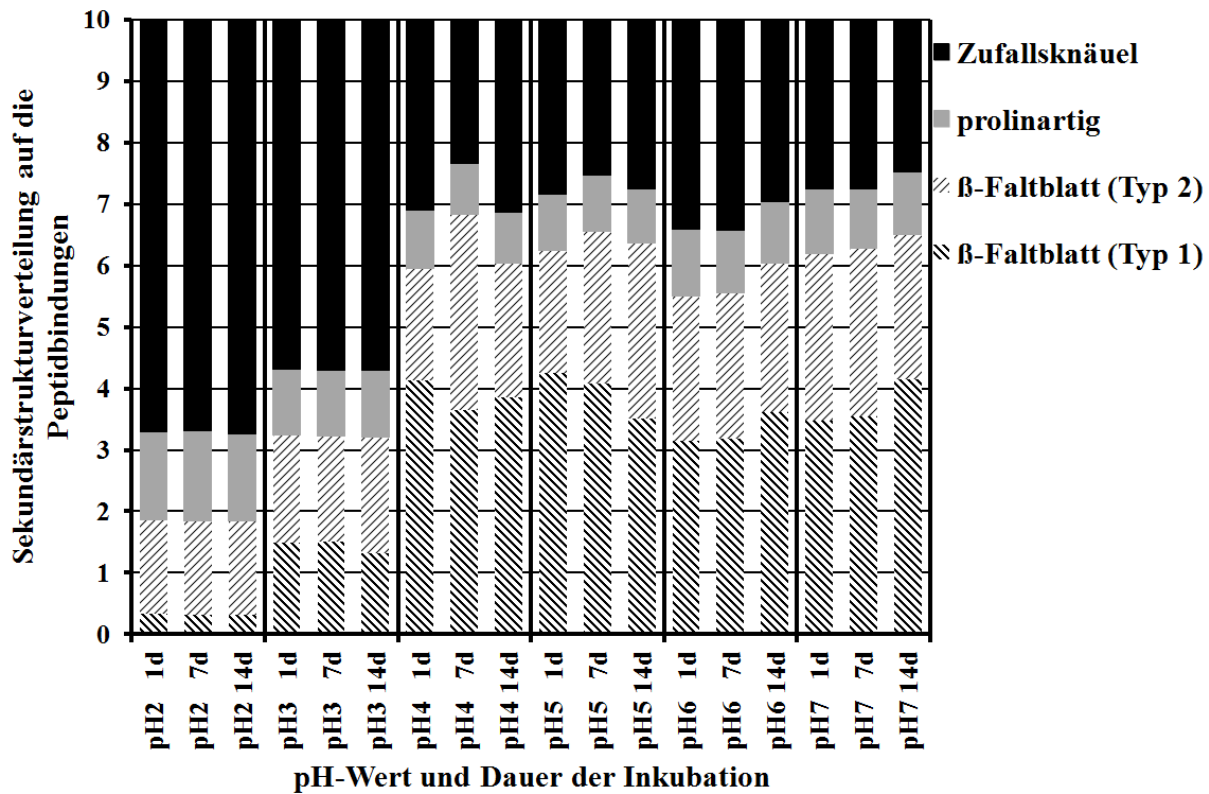


Abb. 33: Sekundärstrukturverteilung von Teverelix-Proben in Abhängigkeit vom pH-Wert während der Inkubation und von der Inkubationsdauer

Für Teverelix sind die untersuchten Abhängigkeiten in Abb. 33 visualisiert. Prinzipiell wird erneut eine sprunghafte Veränderung des Verhaltens beim Übergang von pH 3,0 zu pH 4,0 beobachtet, wobei in diesem Fall auch noch ein schwacher, nichtsdestotrotz signifikanter Unterschied zwischen pH 2,0 und pH 3,0 auffällt. Während die Teverelix-Proben bei pH 2,0 annähernd mit den für Cetrorelix bestimmten Werten unterhalb des Sprungbereiches übereinstimmen, ist schon bei pH 3,0 ein Anstieg des β -Faltblatt-Gehaltes zu verzeichnen, der oberhalb von pH 4,0 auf das bei weiterer pH-Erhöhung dann annähernd unverändert hohe Niveau der amyloiden Aggregate ansteigt. Die Differenzen im Verhalten von Cetrorelix und Teverelix bei pH 3,0 sprechen hierbei stark dafür, dass der für die Initiierung der Aggregation maßgebliche pH-Wert sehr nah an pH 3,0 liegt, sodass bereits kleine Abweichungen oder Unterschiede in den Lösungsbedingungen eine bemerkbare Auswirkung auf die Aggregation

des Peptides haben. Eine systematische Zeitabhängigkeit lässt sich wiederum nicht nachweisen, auch wenn die β -Faltblatt-Gehalte für pH 6,0 und pH 7,0 sukzessive mit der Zeit zuzunehmen scheinen.

Abb. 34 illustriert schließlich das pH-Wert- und zeitabhängige Verhalten von Ozarelix-Proben. Auch für diesen GnRH-Antagonisten wird der bereits erläuterte Sprung im Verhalten beim Übergang von pH 3,0 zu pH 4,0 registriert, wobei für alle Proben in Übereinstimmung mit den in Abschnitt 4.1.1.2 besprochenen Ergebnissen ein systematisch höherer Anteil an Zufallsknäuelstrukturen zu verzeichnen ist als für Cetorelix oder Teverelix.

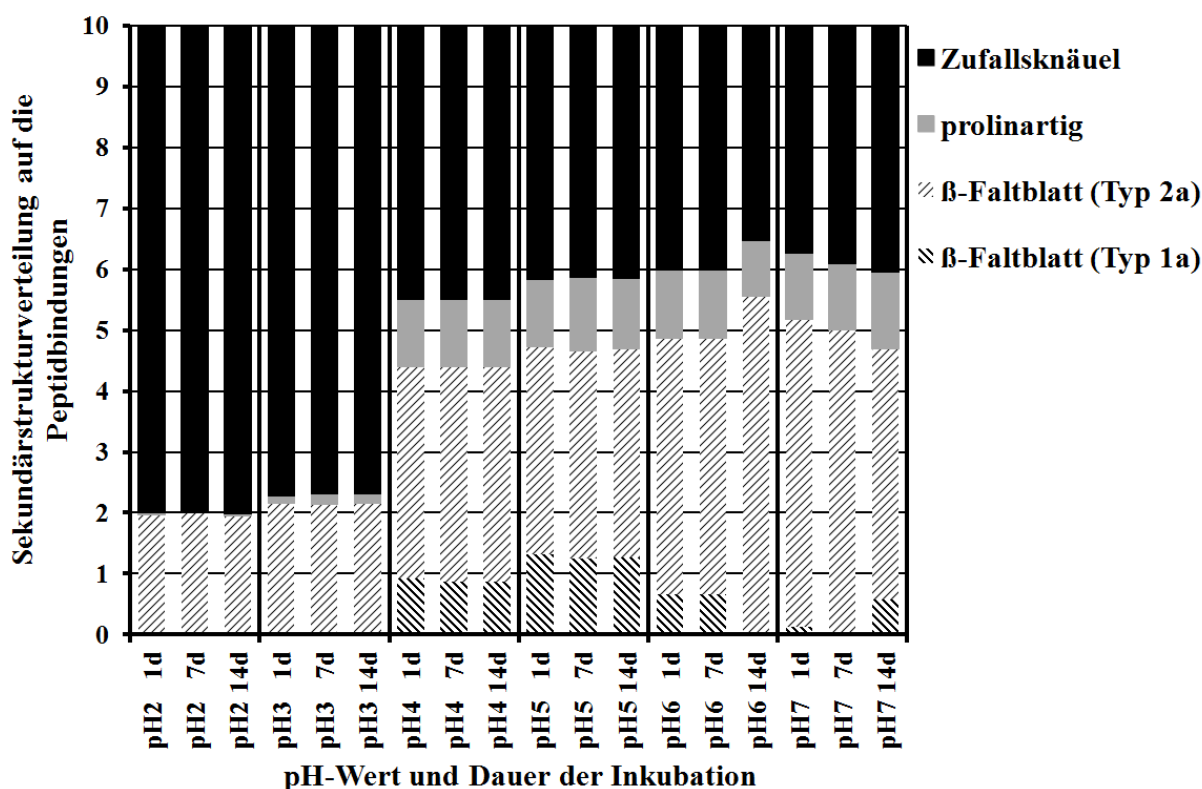


Abb. 34: Sekundärstrukturverteilung von Ozarelix-Proben in Abhängigkeit vom pH-Wert während der Inkubation und von der Inkubationsdauer

4.1.2 Untersuchung der Aggregationsstufen und des Phasenverhaltens von GnRH-Antagonisten

4.1.2.1 Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie (TCSPC) an Teverelix-Lösungen

Mithilfe der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie (TCSPC) konnten bereits in einer früheren Arbeit einzelne Aggregationsschritte von Cetorelix und Ozarelix nachgewiesen werden [Beil, 2012(1)]. In der vorliegenden Arbeit wird das Verfahren auf Teverelix

angewendet, um dessen Verhalten mit den beiden anderen GnRH-Antagonisten vergleichen zu können.

Das Verhalten des monomeren Peptides wird anhand von essigsauren Proben bei pH 3,0 untersucht. Tabelle 22 stellt die dabei für Teverelix erhaltenen, charakteristischen Werte für Fluoreszenz-Lebensdauern und präexponentielle Faktoren den bereits bekannten Werten für Cetrorelix gegenüber.

Tabelle 22: Mittelwerte und Standardabweichungen der ermittelten präexponentiellen Faktoren und Fluoreszenz-Lebensdauern von Teverelix und Cetrorelix in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0)

Teverelix		Cetrorelix*	
präexponentielle Faktoren	Fluoreszenz-Lebensdauern	präexponentielle Faktoren	Fluoreszenz-Lebensdauern
$B_1 = (42,91 \pm 2,69) \%$	$\tau_1 = (4,12 \pm 0,26) \text{ ns}$	$B_1 = (46,85 \pm 2,62) \%$	$\tau_1 = (4,03 \pm 0,30) \text{ ns}$
$B_2 = (44,87 \pm 3,02) \%$	$\tau_2 = (12,31 \pm 0,43) \text{ ns}$	$B_2 = (40,91 \pm 3,03) \%$	$\tau_2 = (11,65 \pm 0,47) \text{ ns}$
$B_3 = (12,22 \pm 0,79) \%$	$\tau_3 = (0,54 \pm 0,06) \text{ ns}$	$B_3 = (12,25 \pm 1,79) \%$	$\tau_3 = (0,50 \pm 0,14) \text{ ns}$

* Die zu Vergleichszwecken angegebenen Werte für Cetrorelix stammen aus BEIL, 2012(1).

Aus Tabelle 22 geht hervor, dass die für Teverelix bestimmten Werte sehr gut mit denen für Cetrorelix übereinstimmen, was aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit nicht weiter verwundert. Die Zuordnung der einzelnen Relaxationsprozesse, die mit den Fluoreszenz-Lebensdauern τ_1 bis τ_3 korrelieren, wird daher in Analogie zu Cetrorelix vorgenommen, wobei die Fluoreszenz-Lebensdauer τ_2 dem Ac-D-Nal(2)¹-Rest des Peptides und die beiden anderen Prozesse dem unterschiedlichen Verhalten der Rotamere des Tyr⁵-Restes zuzuschreiben sind.

Untersuchungen dieser Parameter in Zusammenhang mit der Aggregation von Teverelix werden in 10 mM Ammoniumacetat-Lösung (pH 7,0) durchgeführt, um eine Vergleichbarkeit mit den Werten früherer Arbeiten der Arbeitsgruppe zu gewährleisten. In Abb. 35 ist die in Hinblick auf die Aggregation von Teverelix besonders entscheidende Entwicklung des Verhältnisses zwischen den beiden präexponentiellen Faktoren B_1 und B_3 in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration in diesem Solvens visualisiert.

Der in Abb. 35 aufgetragene Quotient $B_3/(B_1 + B_3)$ gibt Auskunft über die Verteilung der möglichen Rotamere der Tyrosin-Seitenkette in Bezug auf das Peptidrückgrat. Während der ermittelte Quotient für Peptid-Konzentrationen unterhalb von 0,003 mg/ml für eine annähernd ungehinderte Drehbarkeit dieser Seitenkette spricht, indiziert die mit steigender Teverelix-Konzentration beobachtbare Abnahme dieses Quotienten eine zunehmende Einschränkung dieser Drehbarkeit. Dieser Prozess wurde in BEIL, 2012(1) mit der allmählichen Ausbildung einer intermolekularen β -Faltblattstruktur erklärt und kann daher als Äußerung der amyloiden

Aggregation aufgefasst werden. Die beobachtete Abnahme des Quotienten endet abrupt bei einer Peptid-Konzentration von 0,050 mg/ml, was möglicherweise das Ende dieses Aggregationsschrittes und einen Übergang in eine weitere Phase andeutet.

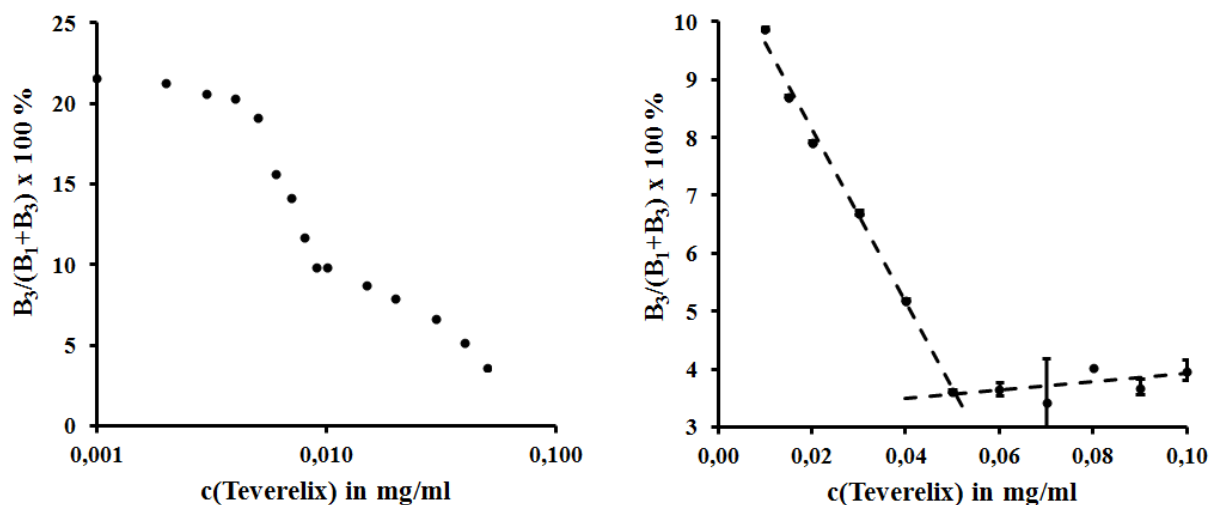


Abb. 35: Konzentrationsabhängige Entwicklung der Relation zwischen den präexponentiellen Faktoren B_1 und B_2 der unterschiedlichen rotameren Zustände des Tyr⁵-Restes von Teverelix in 10 mM Ammoniumacetat-Lösung (pH 7,0)

Parallel dazu steigt die Fluoreszenz-Lebensdauer τ_2 des Ac-D-Nal(2)¹-Restes mit zunehmender Peptidkonzentration im untersuchten Bereich von 14,30 ns auf 19,25 ns sukzessive an. Allerdings sind die Schwankungen dabei so groß, dass in diesem Fall keine signifikanten Verhaltensänderungen bei einer bestimmten Konzentration identifiziert werden können, weshalb auf die explizite Darstellung des Verlaufs verzichtet wird.

4.1.2.2 Konzentrationsabhängigkeit der Flüssigkristallbildung von Teverelix

Wie bereits in der vorangegangenen Masterarbeit gezeigt, bilden die GnRH-Antagonisten Cetrorelix und Ozarelix in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0) bei Überschreiten jeweils charakteristischer Peptidkonzentrationen flüssig-kristalline Mesophasen nematischer Ordnung, deren Doppelbrechungsverhalten bei Verwendung linearer Polarisationsfilter detektiert werden kann [Beil, 2012(1)]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden analoge Experimente für den GnRH-Antagonisten Teverelix durchgeführt.

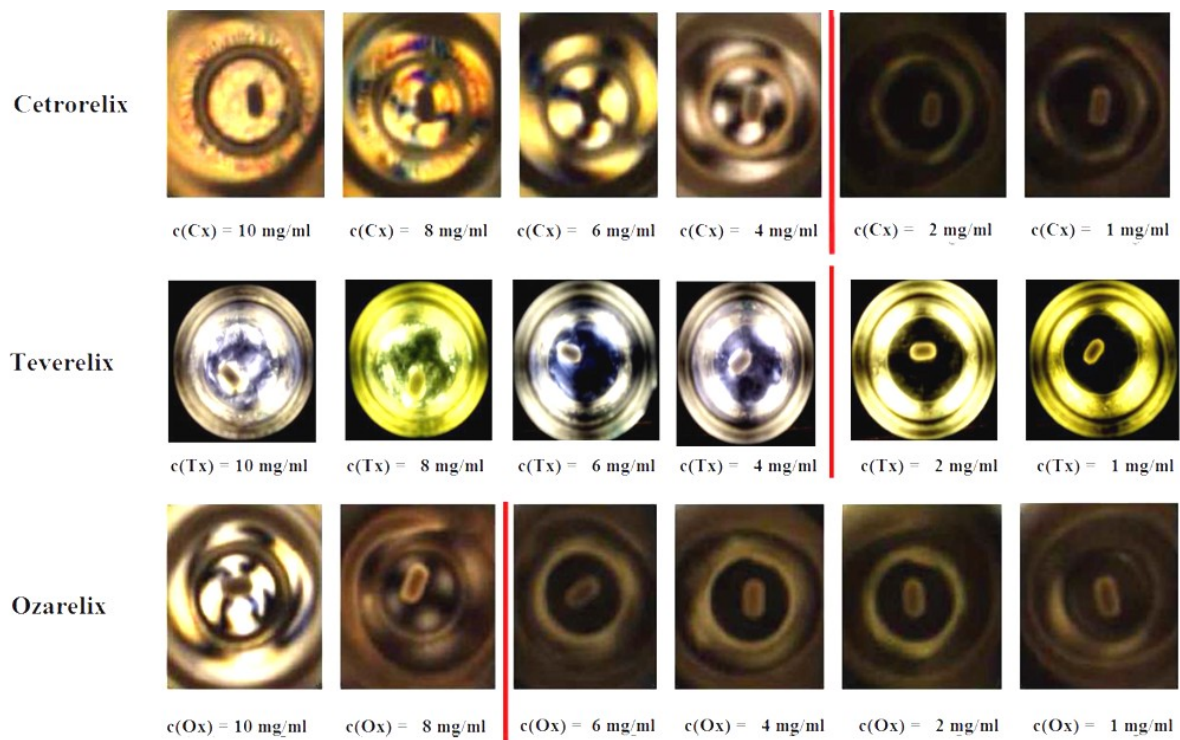


Abb. 36: Aufnahmen von GnRH-Antagonisten-Lösungen bei gekreuzten, linearen Polarisationsfiltern in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration

Abb. 36 stellt die dabei auftretende Konzentrationsabhängigkeit den bereits bekannten Resultaten für Cetrorelix und Ozarelix gegenüber. Die einzelnen Bilder zeigen dabei fotografische Aufnahmen von Rollrandschnappdeckelgefäßen durch gekreuzte, lineare Polarisationsfilter. In dieser gekreuzten Anordnung wird durch die senkrechte Ausrichtung des Detektions-Polarisationsfilters im Verhältnis zur Schwingungsebene des eingestrahnten, linear polarisierten Lichts für eine isotrope Phase eine einheitlich schwarze Fläche beobachtet, wie es in Abb. 36 für niedrige Peptidkonzentrationen der Fall ist. In Teverelix-Lösungen werden jedoch, analog zu Cetrorelix-Lösung bei Peptidkonzentrationen oberhalb von 4 mg/ml weiße oder farbige Areale sichtbar, was nur durch eine innerhalb der entsprechenden Phase auftretende Drehung der Schwingungsebene des Lichtes hervorgerufen werden kann. Daher kann in diesen Lösungen davon ausgegangen werden, dass eine anisotrope Mesophase existiert. Für Ozarelix wird dieser Übergang erst bei Peptidkonzentrationen oberhalb von 8 mg/ml erreicht. Grundsätzlich fällt darüber hinaus ins Auge, dass die erreichten Ordnungsgrade in den Cetrorelix- und Ozarelix-Lösungen zu einer weitreichenden Ausrichtung der gesamten Phase führen, während für Teverelix mehrere lokal begrenzte Areale gemeinsamer Ordnung auftreten.

4.1.2.3 Aggregationsphasendiagramme von Cetrorelix

In Vorbereitung auf zielgerichtete Untersuchungen zur dreidimensionalen Struktur von GnRH-Antagonisten in den verschiedenen Aggregationsphasen wird deren Verhalten in Ethanol/Wasser-Gemischen variabler Zusammensetzung in Abhängigkeit von der Temperatur und der Peptidkonzentration untersucht.

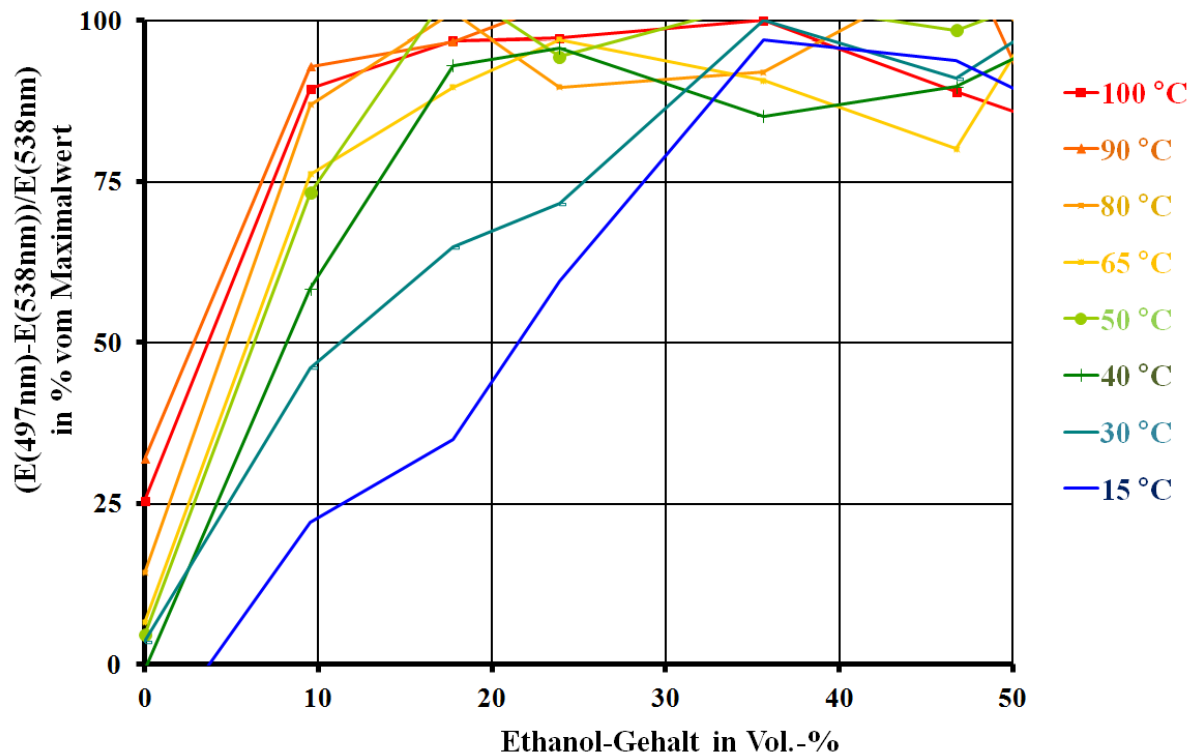


Abb. 37: Veränderung der Kongorot-Absorption in Cetrorelix-Lösung mit einer Peptidkonzentration von 1 mg/ml in Ethanol/Wassergemischen in Abhängigkeit von Solvenszusammensetzung und Temperatur

Zum Zweck der Identifikation des jeweils vorliegenden Aggregationszustandes wird einerseits die Veränderung des Absorptionsspektrums von Kongorot in Gegenwart amyloider Strukturen und andererseits das Auftreten makroskopisch beobachtbarer Doppelbrechung als Kriterium herangezogen. Diese beiden Effekte charakterisieren unterschiedliche Phasen der Aggregatbildung. Während die Sonde Kongorot bereits an mindestens hexamere Strukturen in amyloider Anordnung unter Veränderung ihres UV/vis-Absorptionsspektrums bindet (vgl. Abschnitt 1.3.2), tritt die durch Doppelbrechung indizierte Mesophasenbildung erst auf, wenn die Aggregation bereits soweit fortgeschritten ist, dass die gegenseitige Interaktion großer Aggregate die Ordnung der gesamten Phase beeinflusst.

In Abb. 37 ist die temperaturabhängige Änderung des Kongorot-Absorptionsspektrums anhand des Extinktionsquotienten $(E(497\text{nm})-E(538\text{nm}))/E(538\text{nm})$ für Cetorelix-Proben mit einem einheitlichen Peptidgehalt von 1 mg/ml dargestellt. In der gewählten Auftragung wird dieser Quotient für ungebundenes Kongorot maximal und nähert sich einem Wert von 0 für an amyloide Strukturen gebundenes Kongorot. Aus der Abbildung geht dementsprechend hervor, dass bei niedrigen Temperaturen und geringen Ethanol-Anteilen im Solvensgemisch eine stärkere Aggregation auftritt.

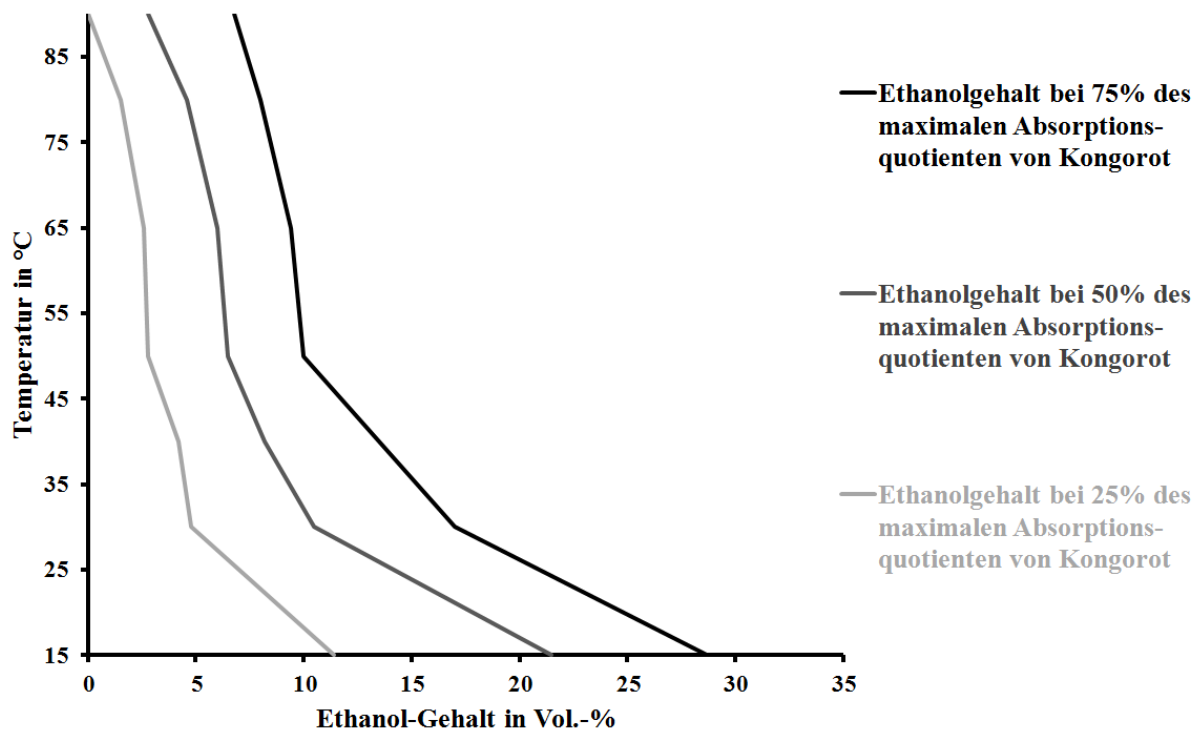


Abb. 38: Visualisierung des Überganges von monomeren zu hexameren Strukturen von Cetorelix bei einer Peptidkonzentration von 1 mg/ml in Ethanol/Wasser-Gemischen in Abhängigkeit von Temperatur und Solvenszusammensetzung

Für die Aufstellung einer Art Aggregationsphasendiagramm auf Basis der in Abb. 37 dargestellten Temperaturkurven ist es notwendig, ein Kriterium zu definieren, welches für die Grenzziehung verwendet wird. Im vorliegenden Fall wird jedoch im Gegensatz zu einem typischen Phasenübergang kein spontaner Sprung in den erfassbaren Eigenschaften sichtbar, weshalb der gewählte Begriff auch nur als leichte Analogie zu verstehen ist. Vielmehr ist an dieser Stelle eine in einem begrenzten Bereich auftretende massive Gleichgewichtsverschiebung zwischen nicht-aggregiertem und aggregiertem Peptid gemeint.

Zur Generierung der in Abb. 38 visualisierten Übergänge wird daher als Kriterium für die genannte Grenzziehung ein Erreichen von 25 %, 50 % bzw. 75 % des für freies Kongorot typischen Extinktionsquotienten definiert, um die allmähliche Verschiebung zu mindestens hexamer vorliegenden Peptidaggregaten zu illustrieren. Für die hierbei untersuchten Proben mit einer Peptidkonzentration von nur 1 mg/ml wird selbst bei dem schwächsten definierten Kriterium, welches schon bei einer Veränderung des Extinktionsquotienten auf 75 % des für freies Kongorot typischen Wertes eine Grenzziehung vornimmt, der Beginn der Aggregation für alle Temperaturen in Ethanol/Wasser-Gemischen mit weniger als 30 % Ethanol beobachtet.

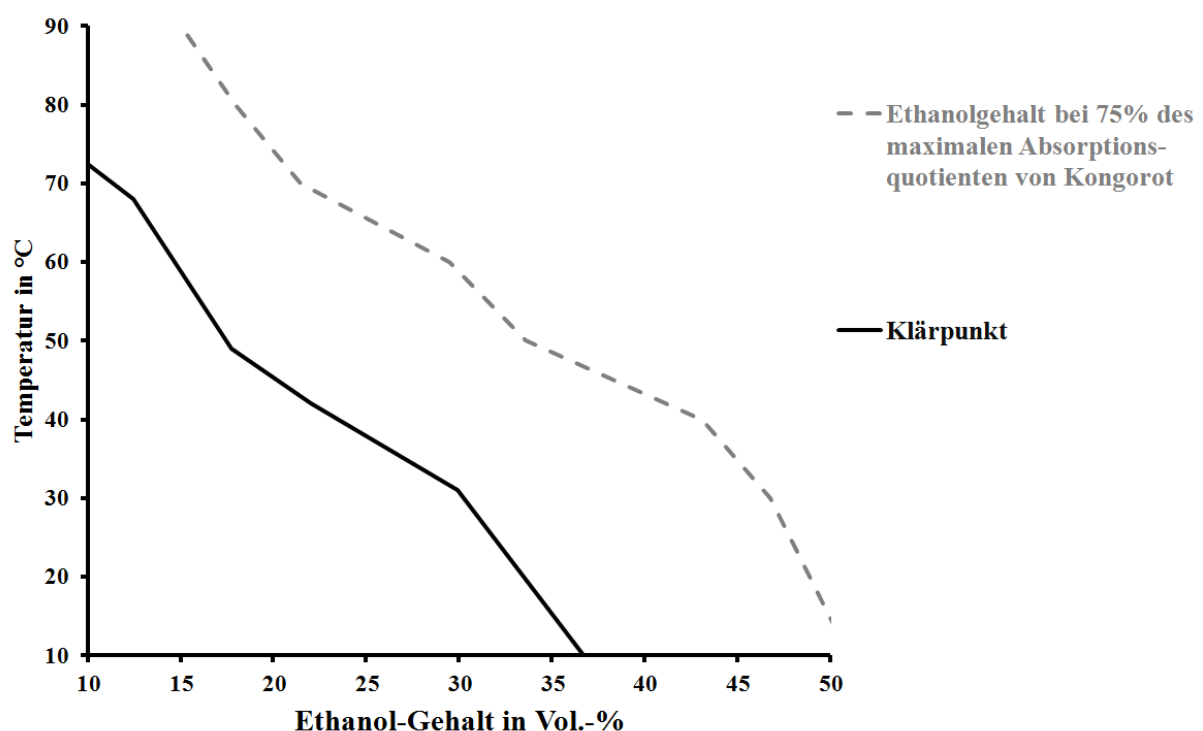


Abb. 39: Visualisierung des Überganges von monomeren zu hexameren Strukturen, sowie zwischen isotroper und nematischer Mesophase von Cetrorelix bei einer Peptidkonzentration von 10 mg/ml in Ethanol/Wasser-Gemischen in Abhängigkeit von Temperatur und Solvenszusammensetzung

In Systemen mit einer GnRH-Antagonisten-Konzentration von nur 1 mg/ml wird auch in rein wässrigen Systemen noch keine Doppelbrechung beobachtet, wie auch aus Abb. 36 ersichtlich ist. Daher können in diesem Fall keine Klärpunkte bestimmt werden.

In Systemen mit Peptidkonzentrationen von 10 mg/ml, die auch perspektivisch den für NMR- oder Kristallisationsexperimente notwendigen Konzentrationsbereichen näher kommen, kann hingegen ebenfalls das Auftreten von Doppelbrechung beobachtet und anhand dessen ein

korrespondierender Klärpunkt bestimmt werden. Abb. 39 vereint die in diesen Lösungen gemessenen Klärpunkte mit den korrespondierenden Kongorotbindungs-Ergebnissen, wobei in diesem Fall nur das Erreichen von 75 % des maximalen Extinktionskoeffizienten aufgetragen ist.

Erwartungsgemäß wird der durch den Klärpunkt indizierte Mesophasenübergang bei niedrigeren Temperaturen und Ethanol-Gehalten erreicht, als der anhand der Sonde Kongorot detektierte Beginn der Hexamerbildung. Weiterhin ist ersichtlich, dass der mithilfe des Kongorots ermittelte Übergang in den Lösungen mit 10 mg/ml Cetorelix im Vergleich zu den Lösungen mit nur 1 mg/ml zu höheren Temperaturen und Ethanolgehalten verschoben auftritt, was lediglich den intuitiv verständlichen Sachverhalt verdeutlicht, dass die Peptidaggregation bei höheren Peptidkonzentrationen forciert wird.

Für die NMR-Spektroskopie ist der Einsatz von DMSO-d₆ gegenüber Ethanol-d₆ als Solvens oder Cosolvens sowohl aufgrund ökonomischer Erwägungen, als auch aufgrund seines aprotischen Charakters eindeutig zu bevorzugen. Aus diesem Grund wird zusätzlich das Phasenverhalten von Cetorelix in DMSO/Wasser-Gemischen bei 25 °C stichprobenartig untersucht, wobei der korrespondierende Klärpunkt bei 70 Vol.-% DMSO ermittelt wird. Somit ist der deaggregierende Effekt von DMSO zwar erheblich niedriger als der von Ethanol, aber der Übergang zwischen monomerer und aggregierter Form lässt sich nichtsdestotrotz auch in DMSO/Wasser-Gemischen bei Raumtemperatur in Abhängigkeit von der Solvenszusammensetzung realisieren, was die Voraussetzung für entsprechende NMR-spektroskopische Untersuchungen darstellt.

4.1.2.4 Aggregationsphasendiagramme von Ozarelix

Zu Vergleichszwecken erfolgen analoge Untersuchungen zum Phasenverhalten in Ethanol/Wasser-Gemischen an Ozarelix-Lösungen mit einer einheitlichen Peptidkonzentration von 1 mg/ml. Das resultierende Diagramm ist in Abb. 40 dargestellt.

Im direkten Vergleich mit Abb. 38 ist zu erkennen, dass für Ozarelix gegenüber Cetorelix systematisch leicht höhere Temperaturen und Ethanol-Gehalte benötigt werden, um die entsprechenden Übergangsgrenzen zu erreichen. Grundsätzlich ist das beobachtete Verhalten allerdings sehr ähnlich.

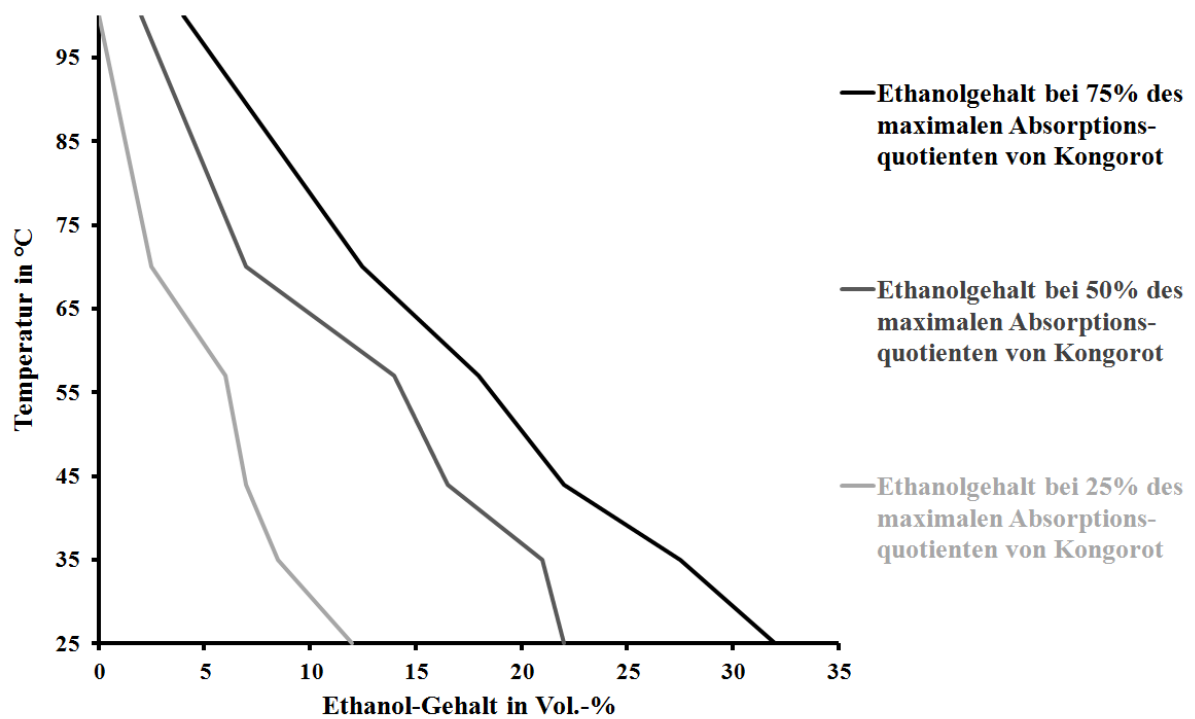


Abb. 40: Visualisierung des Überganges von monomeren zu hexameren Strukturen von Ozarelix bei einer Peptidkonzentration von 1 mg/ml in Ethanol/Wasser-Gemischen in Abhängigkeit von Temperatur und Solvenszusammensetzung

4.1.3 Versuche zur Kristallisation von Cetrorelix-Aggregaten

4.1.3.1 Kristallisationsinitiiierung durch pH-Veränderung

Eine erfolgreiche Kristallisation der amyloiden Peptidaggregate ist eine notwendige Vorbedingung für eine Untersuchung der dreidimensionalen Struktur mithilfe von Röntgenbeugungs-Experimenten. Dabei besteht im vorliegenden Fall die besondere Herausforderung, dass keinesfalls die Kristallisation des monomeren Peptides beabsichtigt ist, sondern seiner intakten Aggregate. Grundsätzlich wird deshalb eine Kristallisation aus der flüssig-kristallinen Mesophase heraus unternommen, welche durch eine gewisse räumliche Fernordnung der Aggregate zustande kommt.

Für den Ansatz der pH-induzierten Kristallisation von Cetrorelix ist der Ausgangspunkt, analog zu Abb. 36, die in essigsaurer Lösung bei pH 3,0 existierende Mesophase, in der durch langsame pH-Anhebung mittels Einleitung von Ammoniakgas der Übergang zum Festkörper ausgelöst wird. Erste Versuche hierzu erfolgten bereits in einer früheren Arbeit, wobei offensichtlich doppelbrechende Strukturen in einer allerdings nicht-doppelbrechenden und daher mit hoher Wahrscheinlichkeit amorphen Matrix entstanden [vgl. Beil, 2012(1)].

Basierend auf diesen Erkenntnissen wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit versucht, durch eine langsamere Ammoniak-Zuführung den amorph ausfallenden Anteil zu reduzieren.

Abb. 41 stellt polarisationsmikroskopische Aufnahmen von erhaltenen Festkörpern aus dem bereits früher beschriebenen Verfahren und dem veränderten Ansatz einander gegenüber.

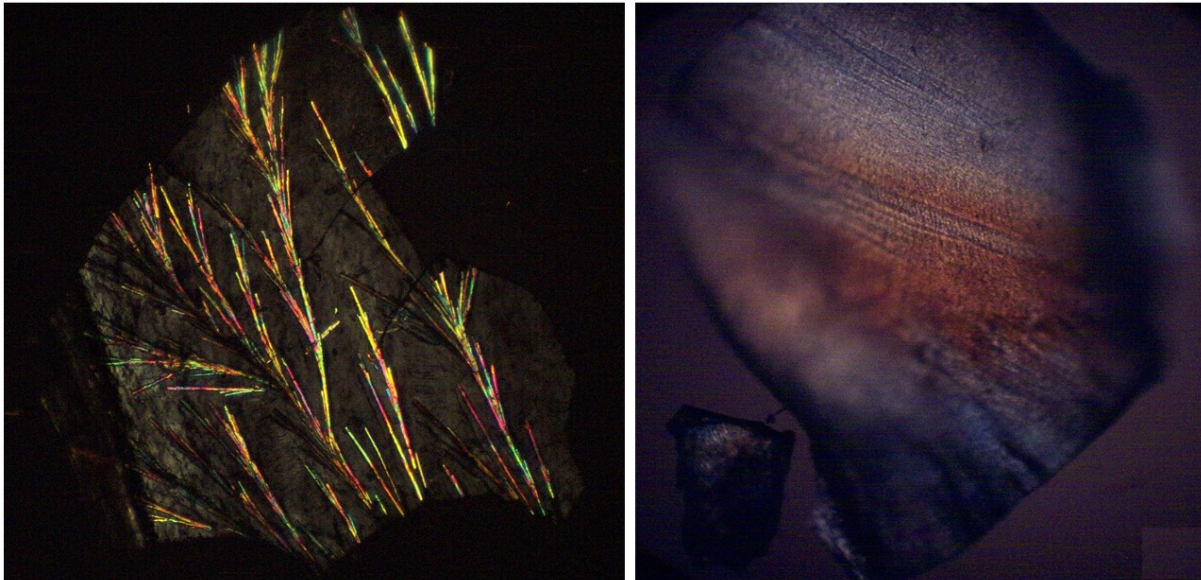


Abb. 41: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen von Cetorelix-Festkörpern bei gekreuzten, linearen Polarisationsfiltern; links: Ergebnis aus Beil, 2012(1); rechts: erhaltener Festkörper bei verlangsamer Ammoniak-Zufuhr; dargestellter Ausschnitt 2 x 2 mm

In beiden resultierenden Festkörpern sind doppelbrechende Areale erkennbar. Während diese nach dem beschleunigten Verfahren aus BEIL, 2012(1) lokal stark begrenzt in einer nicht-doppelbrechenden Matrix vorliegen, scheinen die Areale im verlangsamen Ansatz in größeren Bereichen eine einheitliche Ausrichtung aufzuweisen. Gleichwohl sind die für kristalline Körper typischen, scharfen Bruchkanten im verlangsamen Ansatz nicht zu erkennen, was gegen eine durchgehend kristalline Ordnung spricht.

Daher wird die pH-induzierte Kristallisationsstrategie im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

4.1.3.2 Kristallisationsinitiierung durch Temperatur-Veränderung

Ein klassischer Ansatz für eine gezielte Kristallisation besteht in der Ausnutzung eines temperaturabhängigen Phasenüberganges in einem bestimmten Solvenssystem. Unter Nutzung des in Abb. 39 dargestellten Phasendiagramms werden für Cetorelix zwei verschiedene Kristallisationsansätze näher untersucht.

Aufgrund des typischerweise langsamen Ablaufs der Bildung einer festen Phase unter Kristallisationsbedingungen ist eine Aufstellung eines Phasendiagrammes unter Berücksichtigung der Ausbildung der festen Phase in diesem Fall nicht mit vertretbarem Aufwand zu bewerkstelligen. Allerdings ist die Bildung einer festen Phase aus einer flüssig-kristallinen Mesophase bei entsprechender Absenkung der Temperatur mit hoher Wahrscheinlichkeit zu erwarten, wobei die notwendige Temperaturdifferenz zum Übergang zwischen isotroper und flüssig-kristalliner Phase jedoch nicht exakt prognostiziert werden kann.

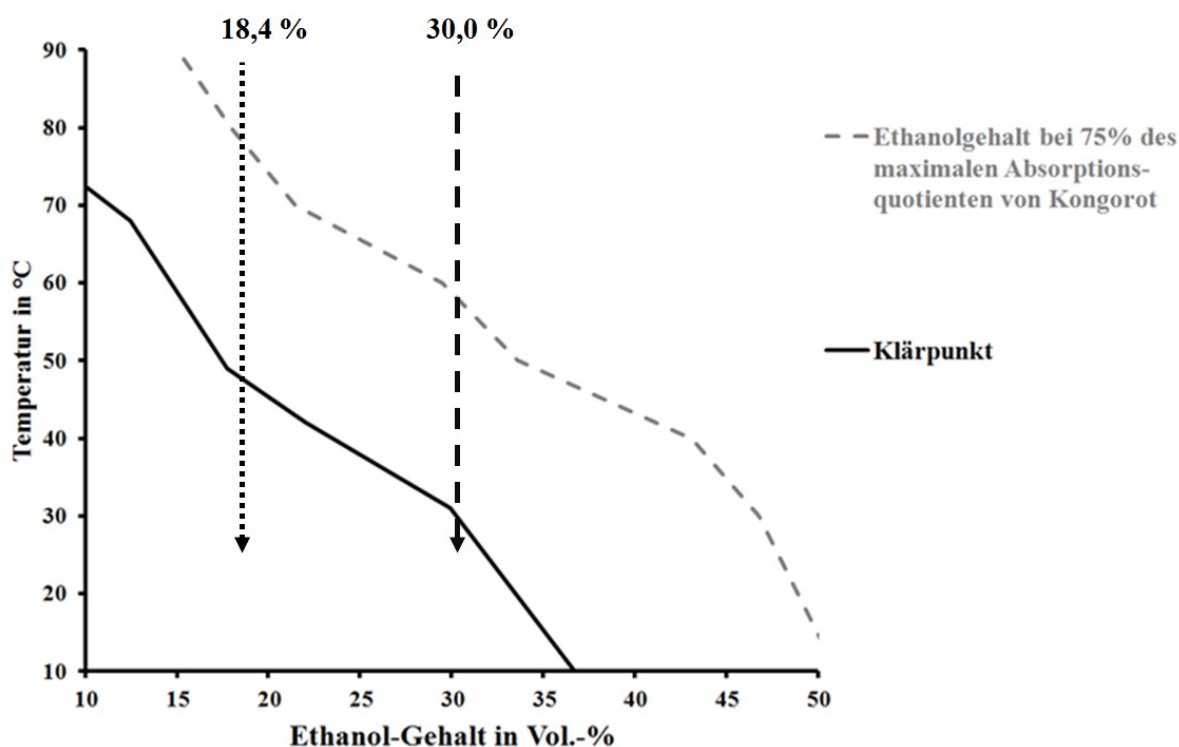


Abb. 42: Veranschaulichung der beiden Ansätze zur temperatur-induzierten Kristallisation von Cetrarelix-Aggregaten aus Ethanol/Wasser-Gemischen mit 18,4 Vol.-% bzw. 30,0 Vol.-% Ethanol; Pfeilspitze markiert die erreichten Bedingungen zum Ende des Experimentes

Abb. 42 veranschaulicht die Temperaturführung der beiden Kristallisationsversuche bei Ethanol-Gehalten von 18,4 Vol.-% und 30,0 Vol.-% im korrespondierenden Aggregationsphasendiagramm. Es wird dabei deutlich, dass bei dem Ansatz mit 30,0 Vol.-% Ethanol im Solvensgemisch die durch den Klärpunkt indizierte Phasengrenze zwischen isotroper Lösung und nematischer Mesophase nur geringfügig, im Fall des Ansatzes mit 18,4 Vol.-% Ethanol jedoch massiv unterschritten wird.

Nach langsamer Absenkung der Temperatur auf RT gemäß Abschnitt 3.8.4.2 werden beide Proben für 14 Tage bei RT erschütterungsfrei inkubiert und polarisationsmikroskopisch untersucht. Für den Kristallisationsansatz mit 30,0 Vol.-% Ethanol sind die erhaltenen Aufnahmen in Abb. 43 zu sehen. Bei paralleler Anordnung der Polarisationsfilter können optisch kleine, dunkel erscheinende Objekte ausgemacht werden, die möglicherweise feste Keime darstellen. Bei gekreuzter Anordnung wird hingegen die immer noch bestehende, flüssig-kristalline Mesophase anhand der Doppelbrechungsmuster sichtbar, was darauf hindeutet, dass unter diesen Bedingungen der Übergang zur festen Phase nach 14 Tagen zumindest nicht weit fortgeschritten ist und daher entweder nicht vollständig ablaufen oder einen sehr langen Zeitraum beanspruchen würde.

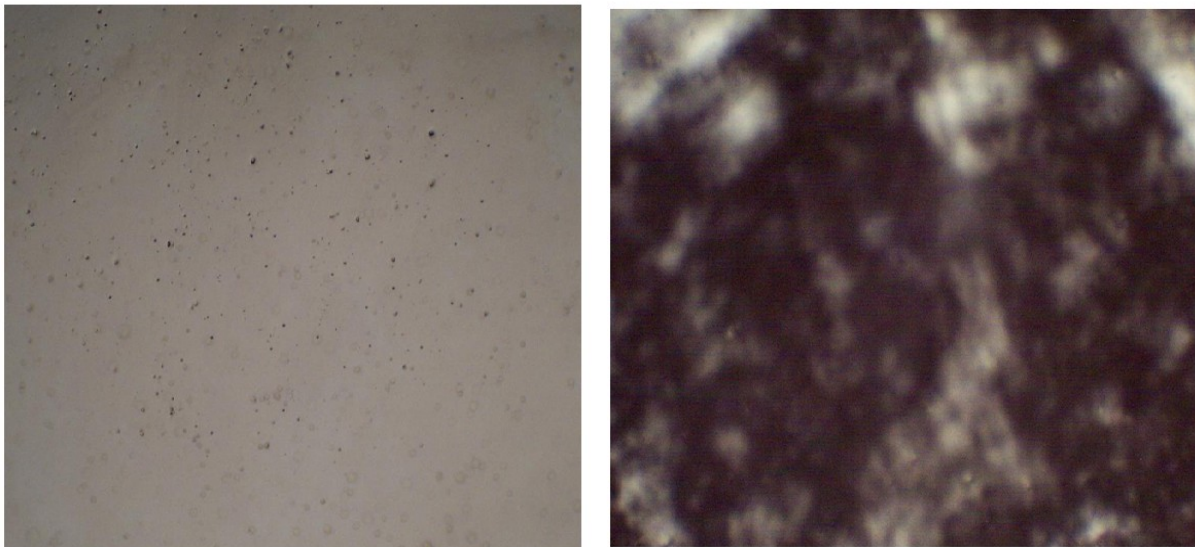


Abb. 43: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen des Ansatzes zur Kristallisation von Cetrarelix-Aggregaten aus einem Ethanol/Wassergemisch mit 30,0 Vol.-% Ethanol nach 14 Tagen bei 40-facher Vergrößerung; links: Aufnahme bei paralleler Anordnung der linearen Polarisationsfilter; rechts: Aufnahme bei gekreuzter Anordnung der linearen Polarisationsfilter

Analoge Aufnahmen für den zweiten Kristallisationsansatz bei 18,4 Vol.-% Ethanol sind in Abb. 44 dargestellt. In diesem Fall äußert sich ein gänzlich anderes Verhalten. Bei paralleler Anordnung der Polarisationsfilter werden bis zu 4 mm im Durchmesser große, sich in der flüssigen Umgebung rasch bewegendes Objekte sichtbar, die bei gekreuzter Anordnung der Polarisationsfilter Doppelbrechungsmuster aufweisen. Gleichzeitig erscheinen große Areale der umgebenden Phase nicht doppelbrechend, was auf einen Verlust der nematischen Ordnung aufgrund einer lokalen Abnahme des Peptidgehaltes hindeutet.

In einem separaten Experiment wird der in Abb. 44 abgebildeten Probe unter dem Mikroskop ein Tropfen Kongorot-Lösung zugesetzt, was zu der in Abb. 45 zu erkennenden Färbung führt. Die offensichtliche Kolo-kalisation zwischen doppelbrechenden Objekten in Abb. 44 und mittels Kongorot gefärbten Objekten in Abb. 45 stellt eine Korrelation zwischen amyloiden Strukturen und den beobachteten Festkörpern her.

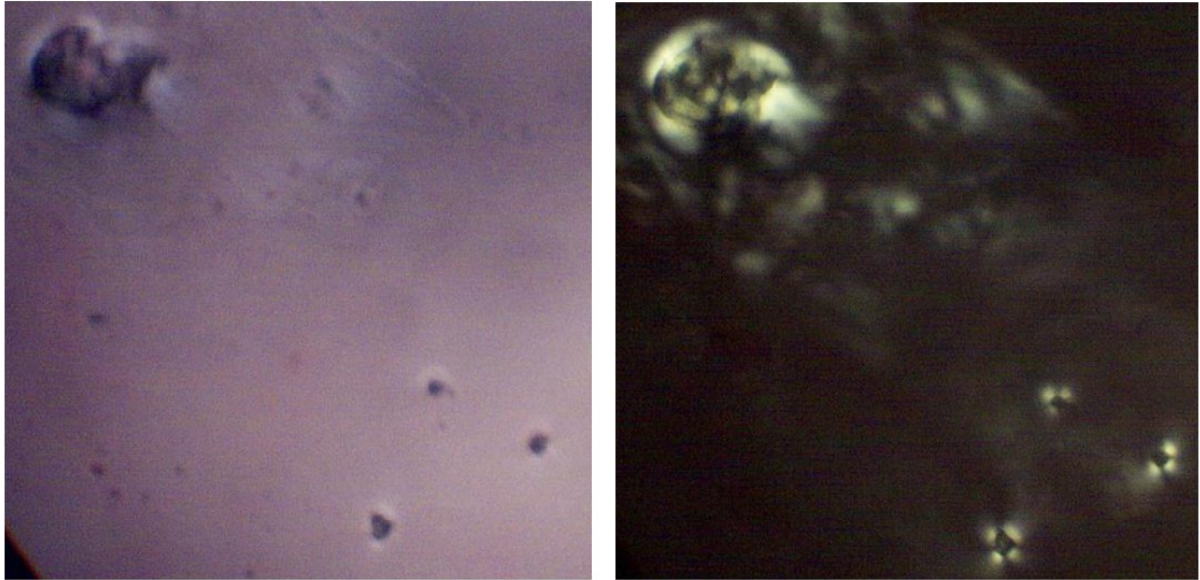


Abb. 44: Polarisationsmikroskopische Aufnahmen des Ansatzes zur Kristallisation von Cetrorelix-Aggregaten aus einem Ethanol/Wassergemisch mit 18,4 Vol.-% Ethanol nach 14 Tagen bei 40-facher Vergrößerung; links: Aufnahme bei paralleler Anordnung der linearen Polarisationsfilter; rechts: Aufnahme bei gekreuzter Anordnung der linearen Polarisationsfilter

Das hochgeordnete Doppelbrechungsmuster der Festkörper ist in Abb. 46 anhand eines ausgewählten Objektes noch einmal im Detail dargestellt. Es ist zu erkennen, dass das Objekt annähernd rund ist und ein geordnetes Doppelbrechungsmuster mit vier Sektoren zeigt. Dieses Muster spricht für eine strikt rotationssymmetrische Anordnung innerhalb des Objektes.

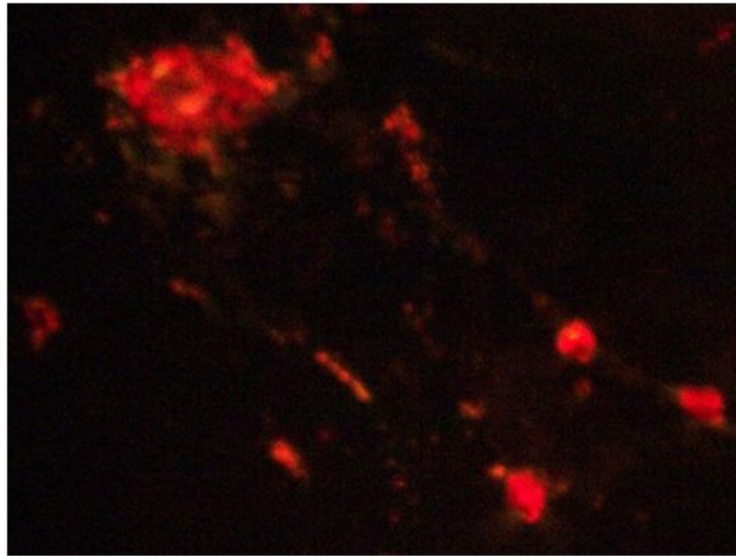


Abb. 45: Polarisationsmikroskopische Aufnahme einer mittels Kongorot gefärbten Probe des Kristallisationsansatzes von Cetorelix-Aggregaten aus einer Lösung mit 18,4 Vol.-% Ethanol bei gekreuzten, linearen Polarisationsfiltern mit 40-facher Vergrößerung

Die Isolierung der beschriebenen Festkörper aus der hochviskosen Mutterlauge gestaltete sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch äußerst problematisch und gelang nicht ohne gleichzeitigen Verlust der doppelbrechenden Eigenschaften, was die Durchführung von Röntgenbeugungsuntersuchungen verhinderte.

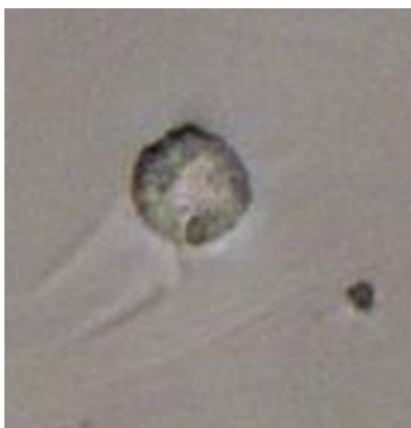


Abb. 46: Detailansicht eines doppelbrechenden Objektes aus dem Kristallisationsansatz von Cetorelix-Aggregaten aus einem Ethanol/Wasser-Gemisch mit 18,4 Vol.-% Ethanol bei paralleler Anordnung (links) bzw. gekreuzter Anordnung (rechts) der Polarisationsfilter

4.1.4 NMR-Untersuchungen

4.1.4.1 Signalzuordnung von Cetrorelix-Acetat in binären Solvensmischungen aus DMSO-d₆ und D₂O

Die Zuordnung der ¹H-, ¹³C- und ¹⁵N-Signale wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit für alle untersuchten Peptide auf Basis von eindimensionalen und zweidimensionalen homonuklearen sowie heteronuklearen NMR-Experimenten durchgeführt. Es erfolgt an dieser Stelle keine umfassende Diskussion aller für die Zuordnungen notwendigen Spektren und der darin enthaltenen Korrelationen, sondern es wird lediglich exemplarisch anhand der ¹H/¹³C-HSQC- sowie der ¹H/¹⁵N-HSQC-Spektren die Signallage der zugeordneten Kerne demonstriert und auf Besonderheiten hingewiesen.

Zum Zweck der Zuordnung der NMR-Signale von Cetrorelix wird die Abb. 47 zu entnehmende Nomenklatur der NMR-aktiven Gruppen verwendet. Die Nomenklatur folgt einem System, nach welchem die Atome des Peptidrückgrates ausgehend vom N-Terminus fortlaufend nummeriert werden. Seitenkettengruppierungen tragen die Ziffer des entsprechenden α-Kohlenstoff-Atoms und mit zunehmendem Abstand zum Peptidrückgrat Buchstabenergänzungen in alphabetischer Reihenfolge. Symmetrisch angeordnete Gruppen tragen denselben Buchstaben und werden durch eine zusätzliche Ziffer unterschieden. Sauerstoff-Kerne, die keine kovalente Bindung zu einem Wasserstoff-Kern aufweisen, werden ignoriert, da sie nicht NMR-aktiv sind.

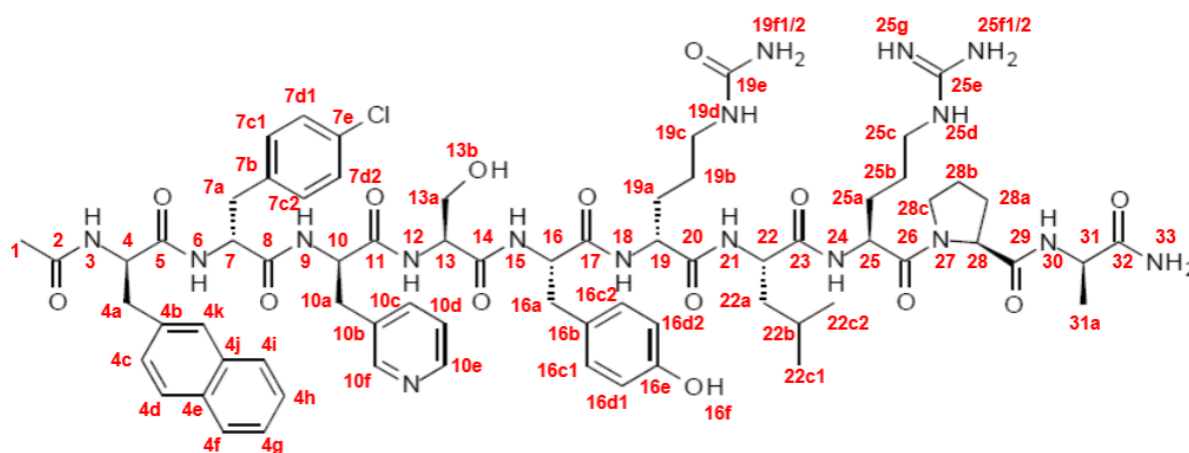


Abb. 47: Verwendete Nomenklatur für die Zuordnung der NMR-Signale von Cetrorelix (Sequenz: Ac-D-Nal(2)¹-D-Phe(4Cl)²-D-Pal(3)³-Ser⁴-Tyr⁵-D-Cit⁶-Leu⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala-NH₂¹⁰)

Abb. 48 zeigt einen Ausschnitt aus dem $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum von Cetrorelix. Dieses Experiment zeigt skalare Kopplungen zwischen Kohlenstoff-Kernen und den jeweils durch kovalente Bindungen direkt benachbarten Wasserstoff-Kernen ($^1J_{\text{CH}}$) (vgl. Abschnitt 1.3.3). Das Experiment ist phasensensitiv, was eine Unterscheidung zwischen Kohlenstoff-Kernen, die mit einer geraden Anzahl (in Abb. 48 rot dargestellt) bzw. ungeraden Anzahl (in Abb. 48 schwarz dargestellt) an Wasserstoff-Kernen kovalent gebunden sind, zulässt.

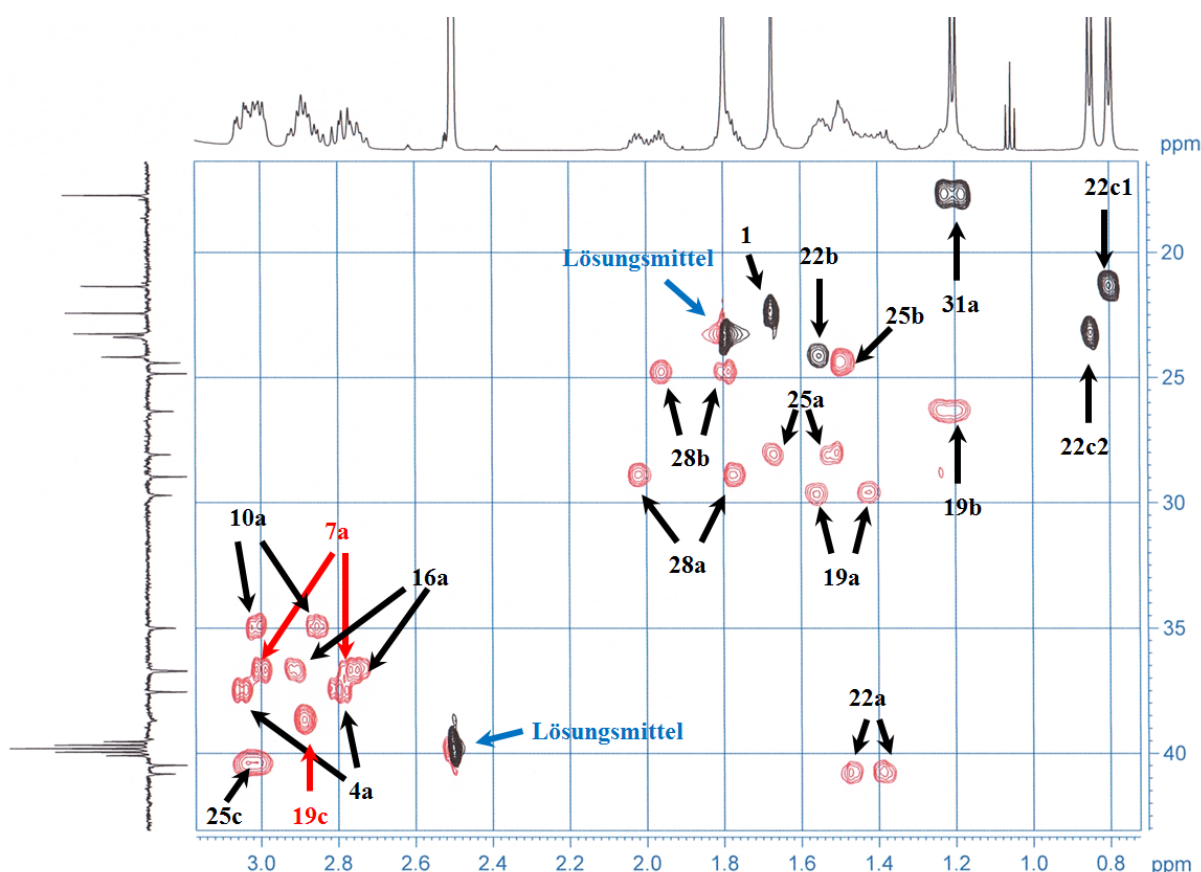


Abb. 48: $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrenausschnitt von Cetrorelix-Acetat in DMSO-d_6 im Bereich der Methyl- und Methylen-Signale

Der in Abb. 48 abgebildete Ausschnitt zeigt den Bereich chemischer Verschiebungen, die für Methyl- und Methylen-Gruppen charakteristisch sind. So lassen sich die Methylgruppen des N-terminalen Acetylrestes (1), des Leu⁷ (22c1 & 22c2) und des D-Ala-NH₂¹⁰ (31a) bei niedrigen Werten für die chemischen Verschiebungen der entsprechenden ^1H - und ^{13}C -Kerne detektieren. Diastereotope Protonen in CH_2 -Gruppen zeigen in der Regel unterschiedliche ^1H -Verschiebungen, erscheinen im $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC aber natürlich bei ein und derselben ^{13}C -Verschiebung. Dies betrifft im vorliegenden Fall neben allen CH_2 -Gruppierungen des

Pro⁹ vor allem die Verschiebungen der CH₂-Gruppen des β -Kohlenstoff-Atoms der Aminosäure-Reste.

Abb. 49 zeigt den Ausschnitt des ¹H/¹³C-HSQC-Spektrums, der neben den β -CH₂-Gruppen des Pro⁹ und Ser⁴ vor allem die α -CH-Gruppen der Aminosäure-Reste enthält.

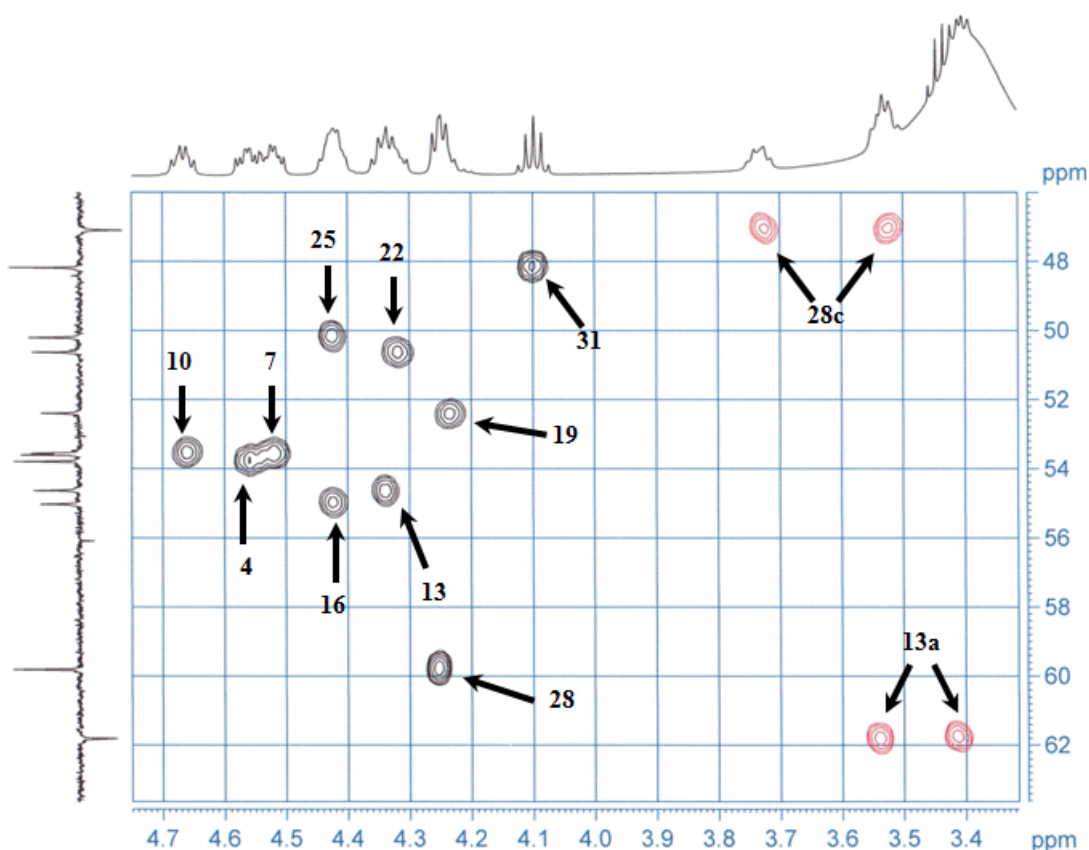


Abb. 49: ¹H/¹³C-HSQC-Spektrenausschnitt von Cetrorelix-Acetat in DMSO-d₆ im Bereich der α -CH-Gruppierungen der Aminosäure-Reste, sowie der β -CH₂-Gruppen von Pro⁹ & Ser⁴

Der verbleibende Ausschnitt des ¹H/¹³C-HSQC-Spektrums von Cetrorelix-Acetat in DMSO-d₆ ist in Abb. 50 gezeigt und enthält die aromatischen CH-Protonen der Reste Ac-D-Nal¹, D-Phe(4Cl)², D-Pal(3)³ und Tyr⁵. Es können somit alle ¹H- und ¹³C-Signale protonentrager Kohlenstoff-Gruppierungen für Cetrorelix zugeordnet werden und im Gegenzug treten keine nicht identifizierbaren Signale auf. Für die Zuordnung der verbleibenden ¹³C-Signale nicht-protonierter Gruppen wird auf ¹H/¹³C-HMBC-Spektren zurückgegriffen, die skalare Kopplungen über mehrere Bindungen hinweg enthalten (insbesondere ²J_{CH} und ³J_{CH}).

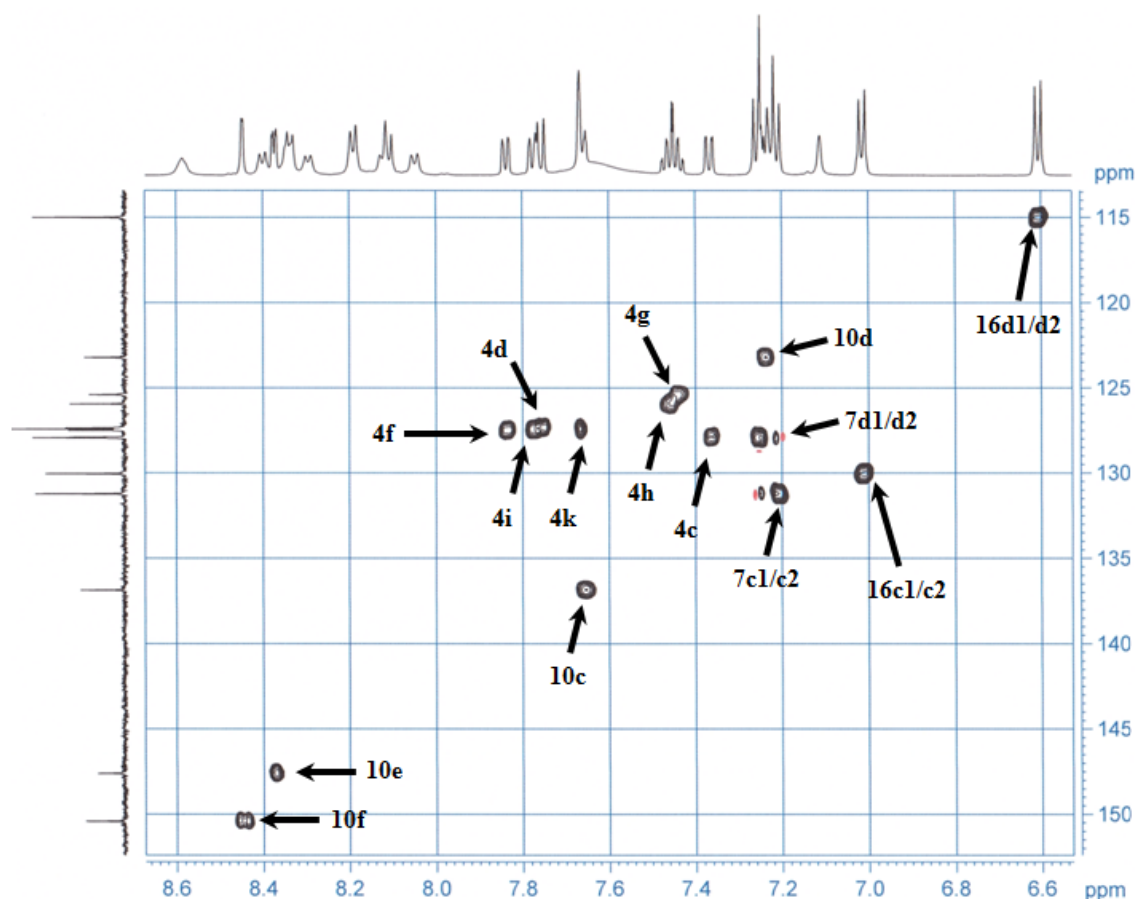


Abb. 50: $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrenausschnitt von Cetorelix-Acetat in DMSO-d_6 im Bereich der aromatischen CH-Gruppierungen

Für die Zuordnung der NH- und NH_2 -Gruppierungen dient ein $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum, welches in Abb. 51 zu sehen ist. Für die Interpretation der gewählten Auftragung sei darauf hingewiesen, dass in der Fachliteratur momentan uneinheitlich zwei verschiedene Skalen für die Angabe von ^{15}N -Verschiebungen in Verwendung ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird stets die IUPAC-konforme Skalierung mit Nitromethan als Referenz eingesetzt.

In Abb. 51 können alle Signale zugeordnet werden, wobei in einem sehr engen Bereich der ^1H -Verschiebungen zwischen 8,0 ppm und 8,4 ppm alle NH-Gruppen des Peptidrückgrates, selbstredend mit Ausnahme des unprotonierten Stickstoffs von Pro^9 , auftreten. Darüber hinaus können alle NH-Signale der Seitenkette von D-Cit^6 und des amidierten C-Terminus von D-Ala-NH_2^{10} aufgefunden werden, wohingegen die Seitenkette des Arg^8 nur unvollständig bezogen auf die NH-Gruppen zuzuordnen ist.

Für Proben von Cetorelix-Acetat in Gemischen aus DMSO-d_6 und D_2O mit 70 Vol.-% bzw. 45 Vol.-% DMSO-d_6 erfolgt eine separate Signal-Zuordnung, wobei in diesen Fällen die ^{13}C -Verschiebungen annähernd solvensunabhängig sind und aufgrund des protischen

Lösungsmittels D₂O keine NH-Korrelationen bestimmt werden können. Daher werden für diese Solvensgemische lediglich die ¹H-Verschiebungen separat aufgeführt. Die entsprechenden Zuordnungstabellen der ermittelten ¹H-, ¹³C- und ¹⁵N-Verschiebungen können dem Anhang in Abschnitt 10.1.1 in Form der Tabellen A1 - A5 entnommen werden.

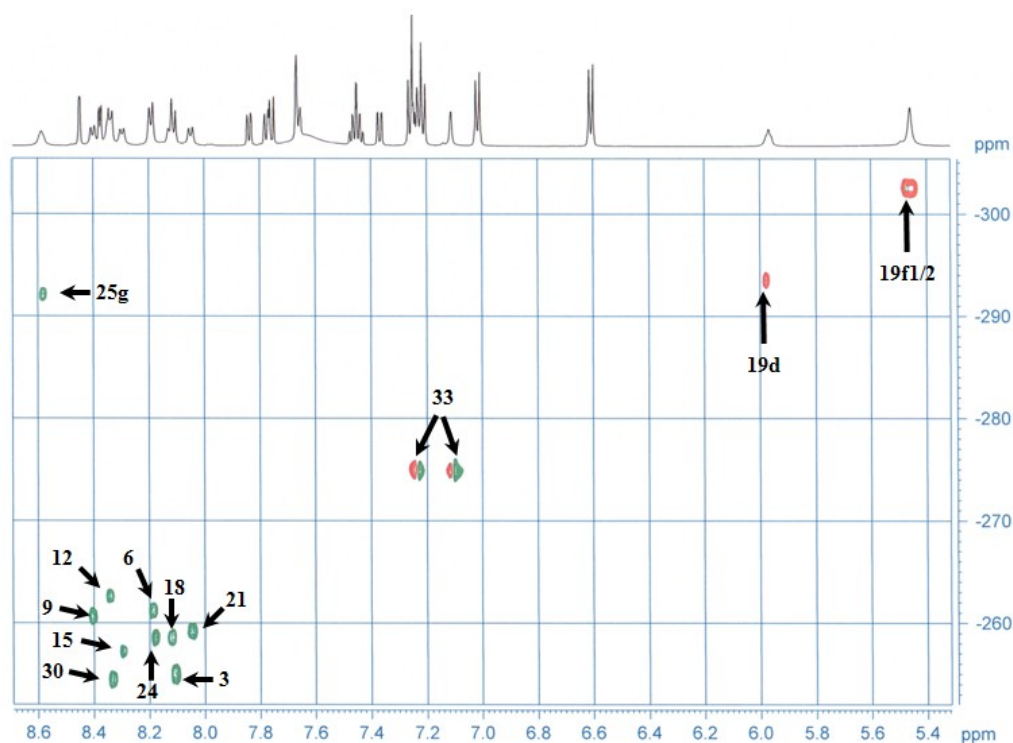


Abb. 51: ¹H/¹⁵N-HSQC-Spektrum von Cetorelix-Acetat in DMSO-d₆

4.1.4.2 Signalzuordnung von Ozarelix-Acetat in DMSO-d₆ und Konfigurationsisomerie der Peptidbindungen

Für die Signalzuordnung von Ozarelix wird die in Abb. 52 visualisierte Nomenklatur verwendet. Die Systematik der Benennung folgt dabei den für Cetorelix skizzierten Prinzipien.

Die NMR-Spektren von Ozarelix-Acetat weisen häufig Signale auf, die zwar ein und derselben Gruppierung zuzuordnen sind, jedoch bei zwei verschiedenen chemischen Verschiebungen auftreten. Die korrelierenden Signale treten dabei in einem Intensitäts-Verhältnis von gleichbleibend ca. 4 : 1 auf, was auf die Präsenz zweier Spezies des Peptides nebeneinander in ebendiesem Verhältnis zueinander hinweist. Um diesem Phänomen Rechnung zu tragen, werden im Folgenden all jene Signale, die der Spezies mit dem geringeren Intensitätsanteil angehören mit "Variante 2" gekennzeichnet.

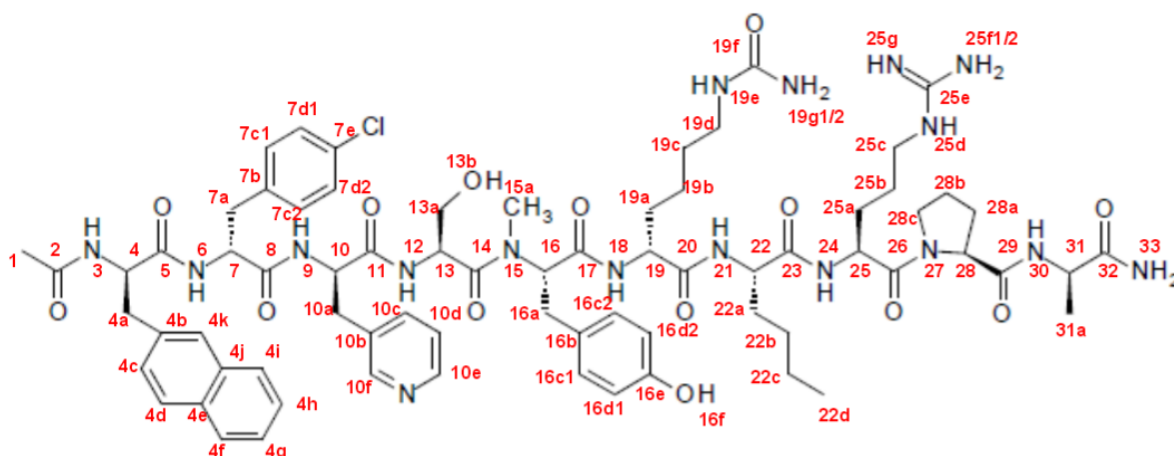


Abb. 52: Verwendete Nomenklatur für die Zuordnung der NMR-Signale von Ozarelix (Sequenz: Ac-D-Nal(2)¹-D-Phe(4Cl)²-D-Pal(3)³-Ser⁴-Tyr(Me)⁵-D-Hcit⁶-Nle⁷-Arg⁸-Pro⁹-D-Ala-NH₂¹⁰)

Der für Methyl- und CH₂-Gruppierungen charakteristische Bereich des ¹H/¹³C-HSQC-Spektrums von Ozarelix-Acetat ist in Abb. 53 widergegeben.

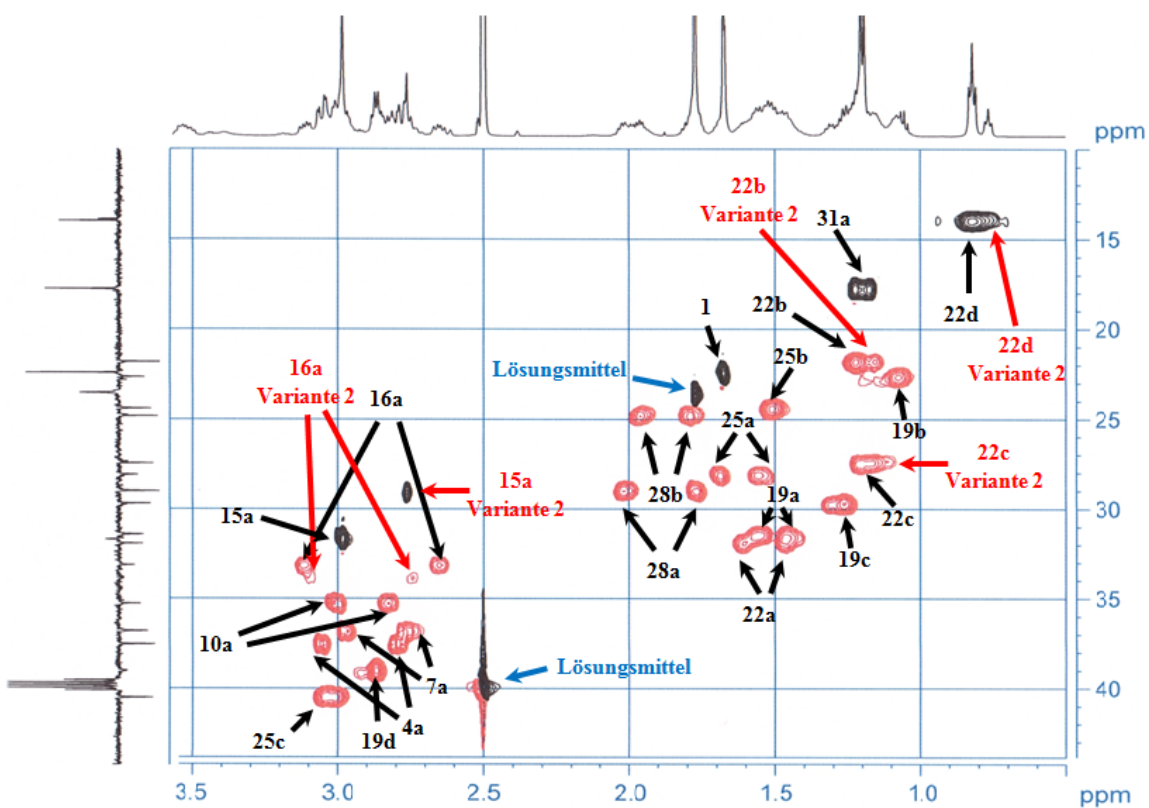


Abb. 53: ¹H/¹³C-HSQC-Spektrenausschnitt von Ozarelix-Acetat in DMSO-d₆ im Bereich der Methyl- und Methylen-Signale

Unterschiedliche Signallagen zwischen den beiden auftretenden Varianten werden insbesondere für Gruppierung von Nle⁷ und Tyr(Me)⁵ beobachtet, wobei sowohl die ¹³C- als auch die ¹H-Verschiebung der Methylgruppe an der Peptidbindung zwischen Ser⁴ und Tyr(Me)⁵ die extremsten Veränderungen aufweisen. Die weiteren Signale lassen sich vollständig zuordnen.

Abb. 54 stellt den Ausschnitt des ¹H/¹³C-HSQC-Spektrums von Ozarelix-Acetat dar, in welchem die α-CH-Gruppierungen zu finden sind. Verschiedene Signallagen werden für D-Pal(3)³, Ser⁴ und Tyr(Me)⁵ detektiert.

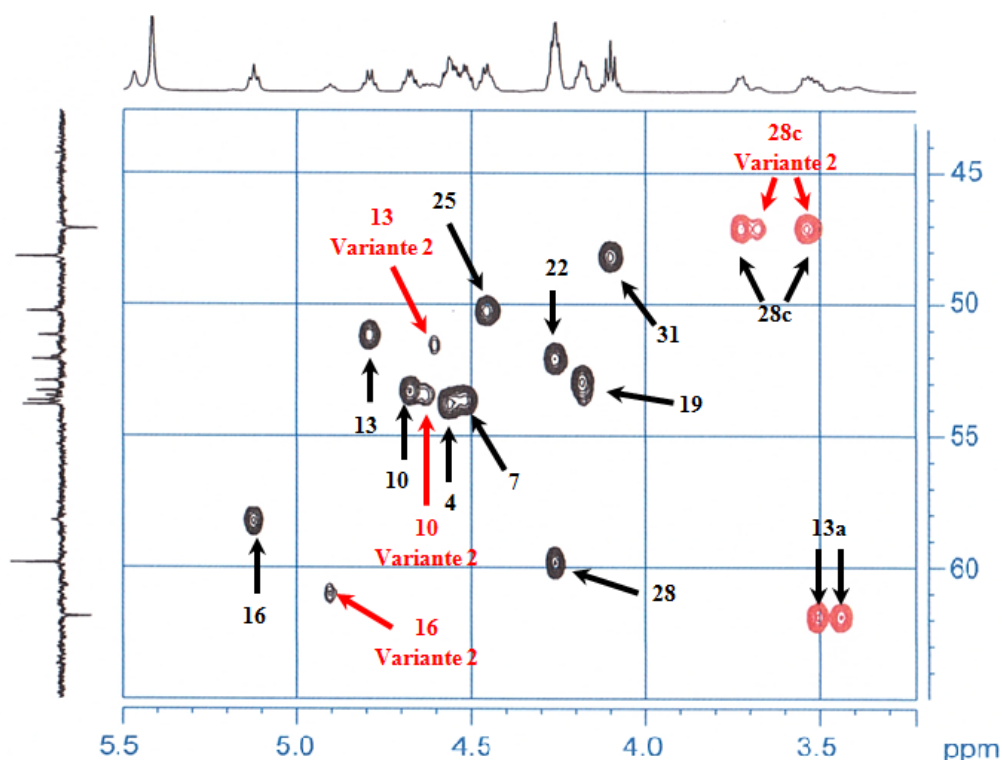


Abb. 54: ¹H/¹³C-HSQC-Spektrenausschnitt von Ozarelix-Acetat in DMSO-d₆ im Bereich der α-CH-Gruppierungen der Aminosäure-Reste, sowie der β-CH₂-Gruppen von Pro⁹ & Ser⁴

Der finale ¹H/¹³C-HSQC-Spektrenausschnitt in Abb. 55 zeigt den Bereich der aromatischen CH-Gruppierungen. Doppelte Signale sind für Tyr(Me)⁵ zu erkennen. Davon abgesehen sind die Signallagen in diesem Bereich sehr ähnlich zu denen von Cetrorelix, was im Wesentlichen darauf zurückzuführen ist, dass der N-terminale Sequenzabschnitt Ac-D-Nal(2)¹-Ser⁴ in beiden GnRH-Antagonisten identisch ist und die aromatischen Reste in diesem Sequenzabschnitt kumuliert vorliegen.

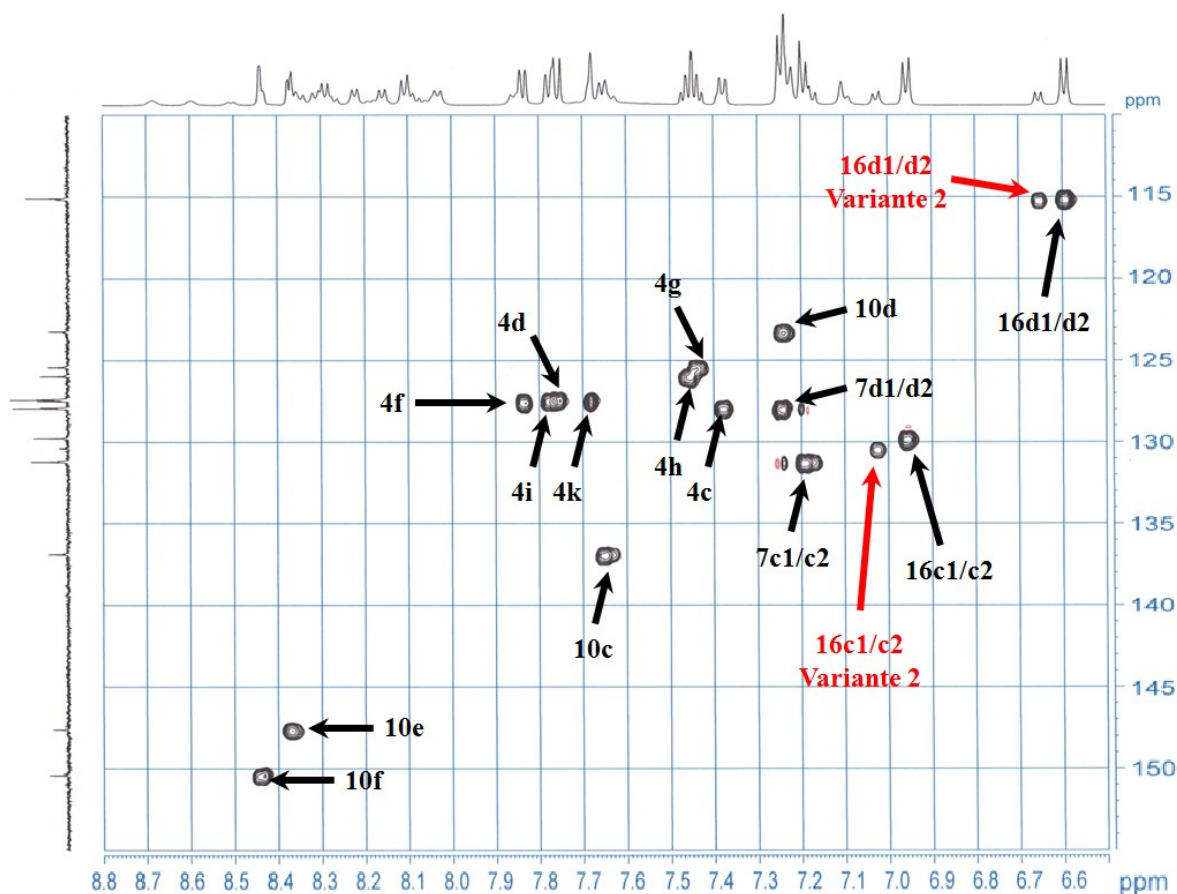


Abb. 55: $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrenausschnitt von Ozarelix-Acetat in DMSO-d_6 im Bereich der aromatischen CH-Gruppierungen

Das $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von Ozarelix ist in Abb. 56 abgebildet. Lediglich für die Seitenkettensignale von D-Hcit⁶ werden zusätzliche Signale detektiert.

Insgesamt gesehen sind damit die größten Veränderungen im Bereich zwischen D-Pal(3)³ und Nle⁷ zu registrieren, mit einem eindeutigen Schwerpunkt an Tyr(Me)⁵. Unter Einbeziehung der veränderten Signallagen sowohl der ^{13}C - als auch der ^1H -Signale der Gruppierungen in Position 15a und 16 bleibt nur die Schlussfolgerung übrig, dass neben der dominanten Ozarelix-Spezies mit einer *trans*-konfigurierten Peptidbindung zwischen Ser⁴ und Tyr(Me)⁵ eine Ozarelix-Spezies mit einer *cis*-konfigurierten Peptidbindung in dieser Position vorliegt. Dieser Befund bestätigt sich in reproduzierbarer Form bei der analogen Untersuchung einer unabhängigen Charge von Ozarelix-Acetat.

Die entsprechenden Zuordnungstabellen können Abschnitt 10.1.2 in Form der Tabellen A6 - A8 entnommen werden.

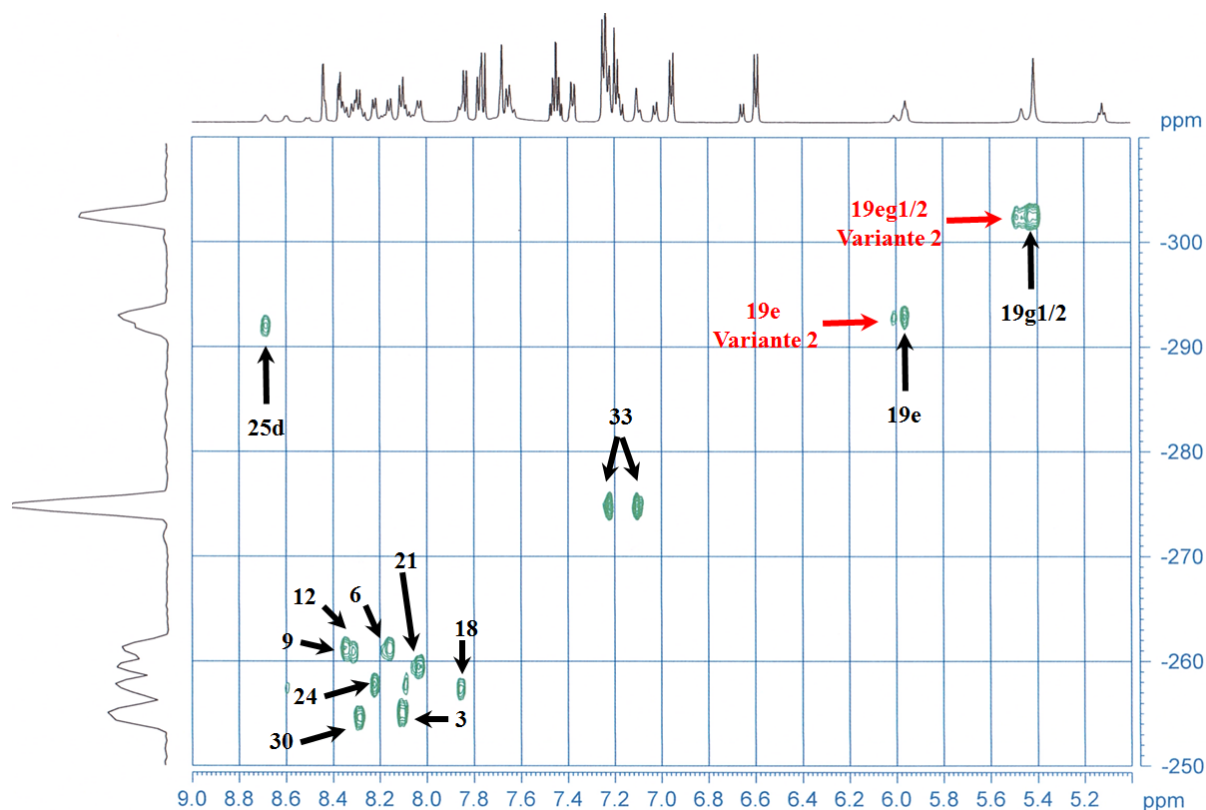


Abb. 56: $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von Ozarelix-Acetat in DMSO-d_6

4.1.4.3 Signalzuordnung von Teverelix-Acetat und Teverelix-Trifluoracetat in DMSO-d_6

Für Teverelix wird die in Abb. 57 angegebene Nomenklatur der NMR-aktiven Gruppen verwendet.

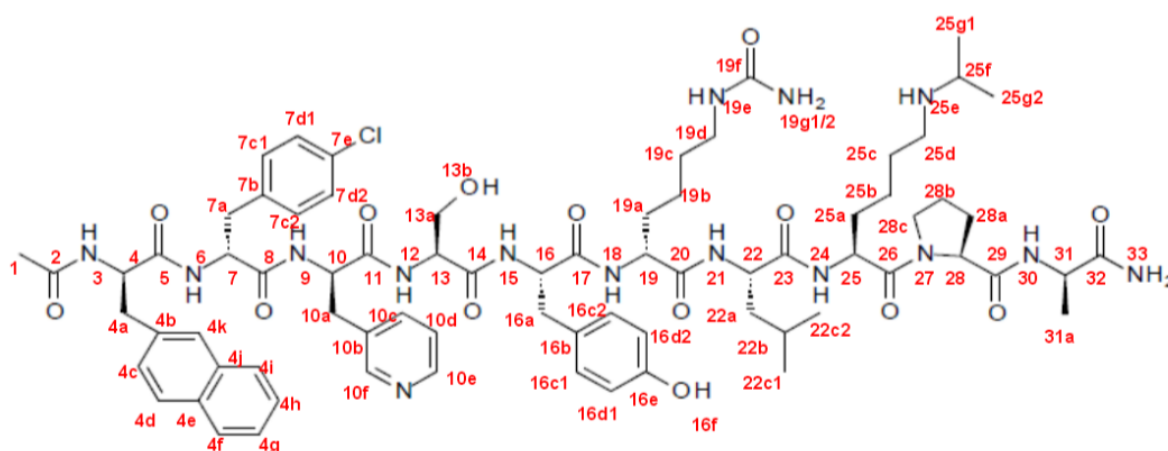


Abb. 57: Verwendete Nomenklatur für die Zuordnung der NMR-Signale von Teverelix (Sequenz: Ac-D-Nal(2)¹-D-Phe(4Cl)²-D-Pal(3)³-Ser⁴-Tyr⁵-D-Hcit⁶-Leu⁷-Lys(iPr)⁸-Pro⁹-D-Ala-NH₂¹⁰)

Im Falle des GnRH-Antagonisten Teverelix werden NMR-Proben für zwei verschiedene Salzformen des Peptides untersucht. Zum einen wird in Übereinstimmung mit den Studien an Cetrorelix und Ozarelix das Acetat von Teverelix, darüber hinaus aber ebenso das Trifluoracetat des Peptides untersucht. Da keine nachträgliche Korrektur des pH-Wertes in den NMR-Proben erfolgt, ist stark davon auszugehen, dass für das Trifluoracetat ein deutlich niedrigerer pH-Wert als für das Acetat während der Messungen vorherrscht. In wässrigen Lösungen werden unter sonst vergleichbaren Umständen pH-Werte von ca. 4,2 (für das Trifluoracetat) und 5,8 (für das Acetat) durch Lösen der entsprechenden Peptidmengen in Reinstwasser erreicht. In perdeuteriertem DMSO kann freilich keine entsprechende Messung durchgeführt werden bzw. würde ein bestimmter pH/pD-Wert noch keine Aussage über die Protonierung bzw. Deprotonierung der vorhandenen Aminosäurereste zulassen. Daher wird die Bestimmung des dominanten Protonierungszustandes mittels NMR-Spektroskopie realisiert.

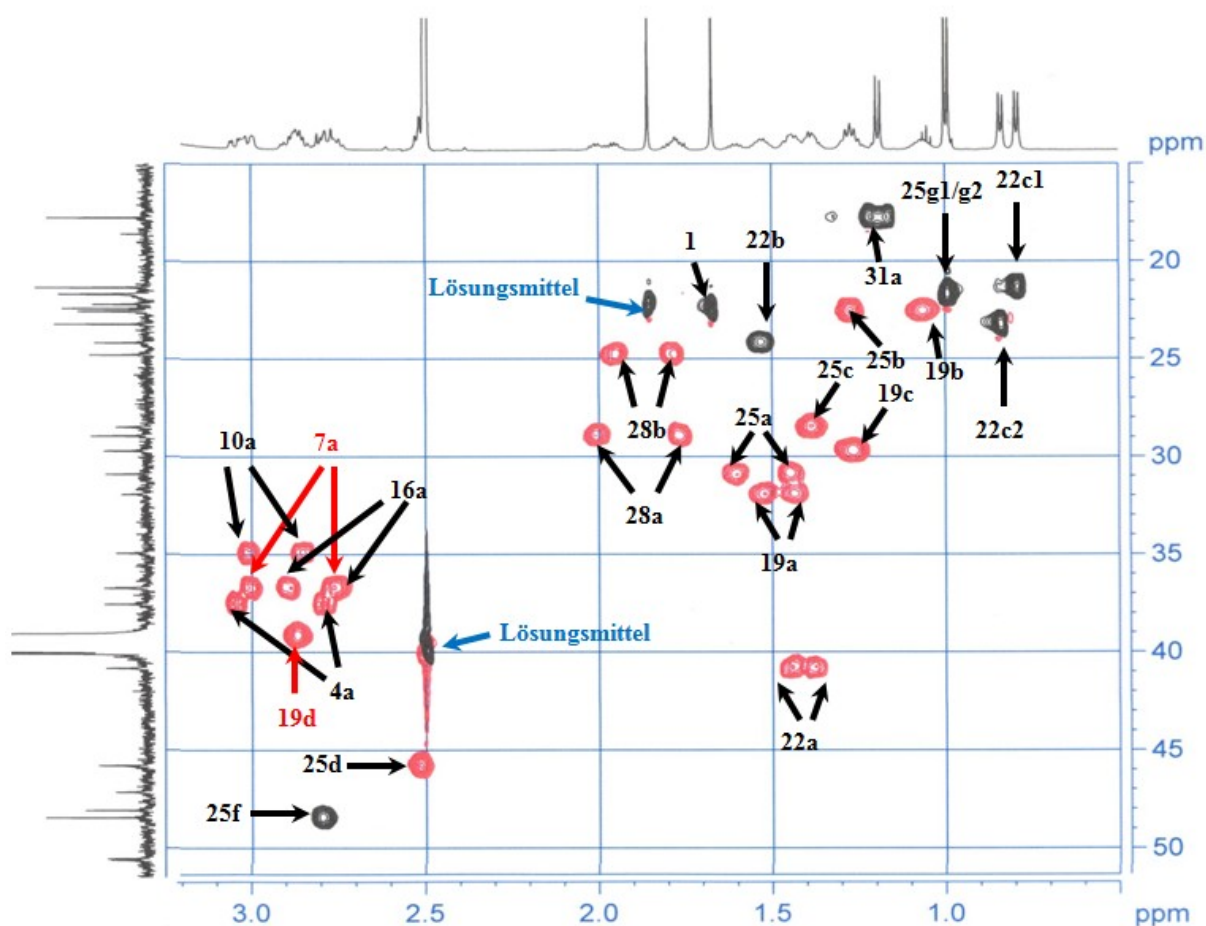


Abb. 58: $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrenauschnitt von Teverelix-Acetat in DMSO-d_6 im Bereich der Methyl- und Methylen-Signale

Die Zuordnung der meisten Signale ist davon jedoch kaum abhängig, weshalb das grundlegende Assignment ausschließlich anhand der Ergebnisse, die sich für das Acetat von Teverelix ergeben, besprochen wird. Abb. 58 zeigt den Ausschnitt des $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrums von Teverelix-Acetat, der für Methyl- und CH_2 -Gruppen charakteristisch ist. Die meisten Signale sind erwartungsgemäß annähernd deckungsgleich mit den korrespondierenden Signalen von Cetrorelix-Acetat in Abb. 48. Einzig die Signale der abweichenden Aminosäure Lys(iPr)⁸ treten als Unterschied zu Tage.

Abb. 59 stellt den $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrenausschnitt dar, welcher im Wesentlichen die α -CH-Signale enthält. Auch in diesem Fall ist annähernd ausschließlich die Signallage der Aminosäure in Position 8 gegenüber Cetrorelix verändert.

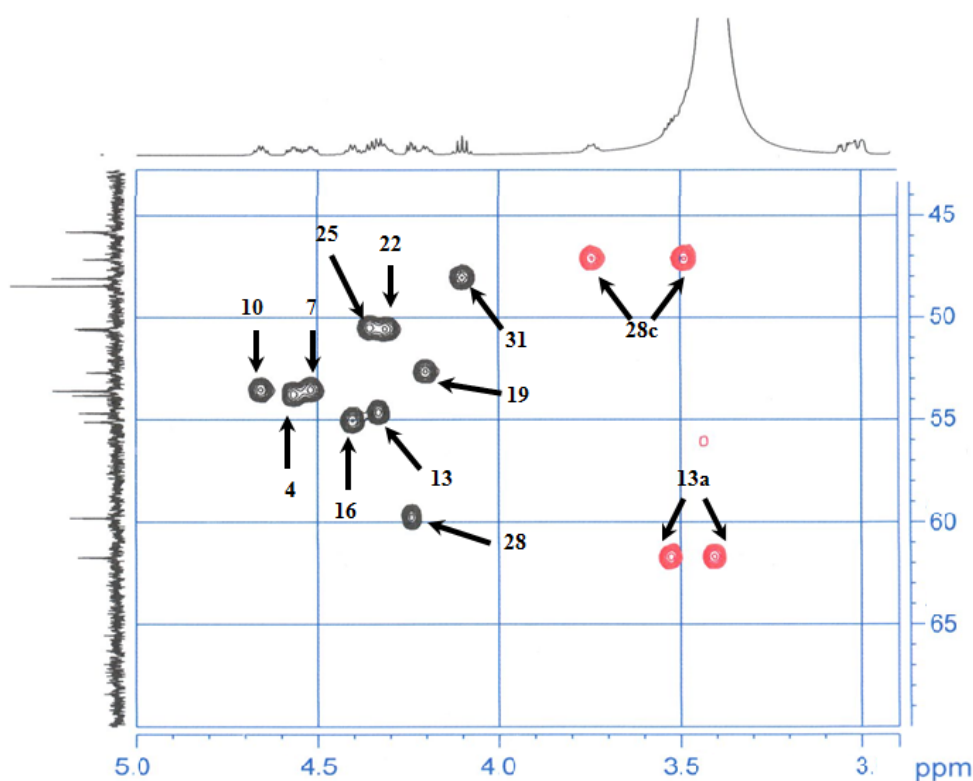


Abb. 59: $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrenausschnitt von Teverelix-Acetat in DMSO-d_6 im Bereich der α -CH-Gruppierungen der Aminosäure-Reste, sowie der β - CH_2 -Gruppen von Pro⁹ & Ser⁴

Der finale Abschnitt des $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrums von Teverelix-Acetat ist in Abb. 60 zu sehen. In diesem Bereich liegen alle aromatischen Signale des Peptides. Da Cetrorelix und Teverelix im Bereich der ersten 5 Aminosäure-Reste sequenzidentisch sind und in diesen Bereich alle aromatischen Aminosäure-Reste der beiden GnRH-Antagonisten fallen, ist es nicht verwunderlich, dass es kaum Unterschiede in den NMR-Signalen dieses Spektrenausschnittes zwischen Cetrorelix und Teverelix gibt.

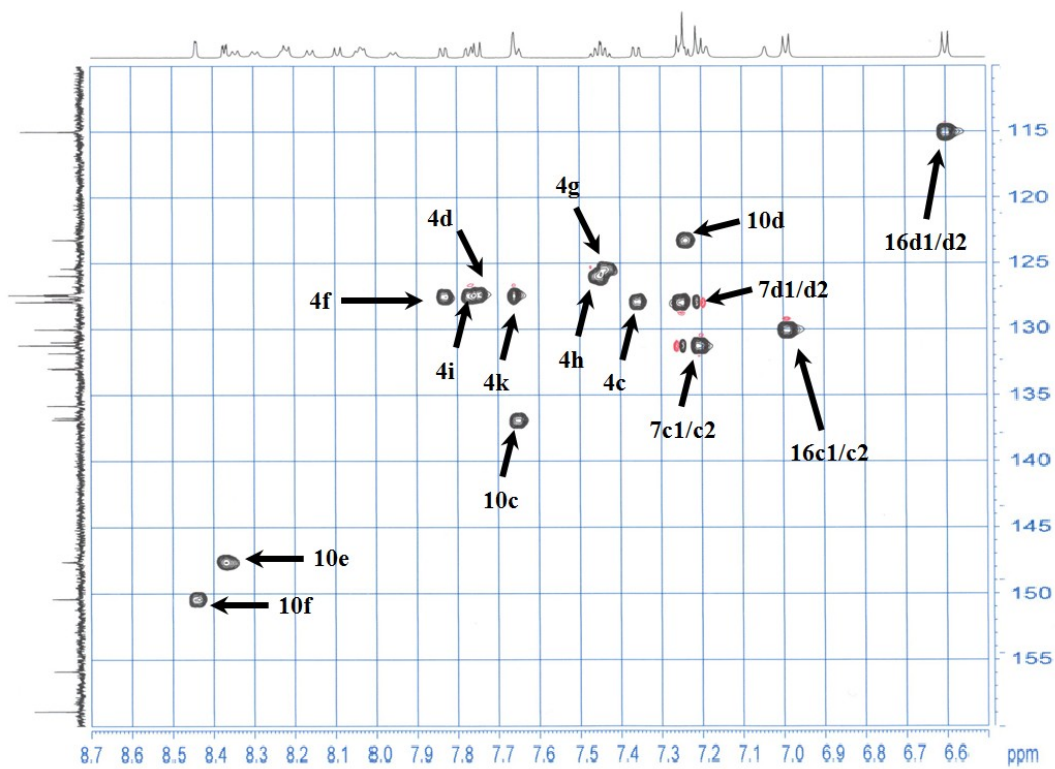


Abb. 60: $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrenausschnitt von Teverelix-Acetat in DMSO-d_6 im Bereich der aromatischen CH-Gruppierungen

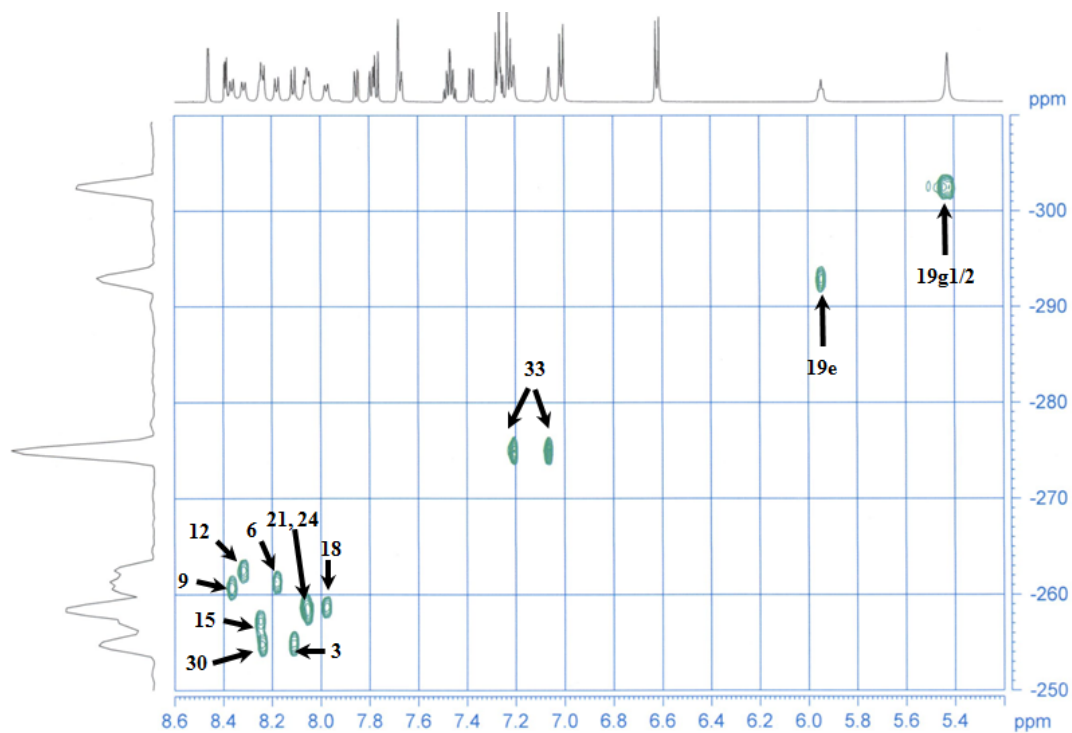


Abb. 61: $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von Teverelix-Acetat in DMSO-d_6

Das $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von Teverelix-Acetat ist schließlich Abb. 61 zu entnehmen. Leider können in diesem keine Signale aus der Seitenkette von Lys(iPr)⁸ detektiert werden, was die Zuordnung der entsprechenden sekundären Amineinheit verhindert.

Der Einfluss des unterschiedlichen pH-Wertes und damit verbunden der unterschiedlichen Protonierungszustände einzelner Gruppen in den NMR-Proben, die entweder aus der Acetat-Form von Teverelix oder aus der Trifluoracetat-Form hergestellt werden, ist in Abb. 62 anhand eines charakteristischen Ausschnittes aus dem jeweiligen $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-Spektrum illustriert. Während die aromatischen Seitenketten-Signale von Ac-D-Nal(2)¹, D-Phe(4Cl)² und Tyr⁵, die im entsprechenden Spektralbereich ebenfalls auftreten, annähernd unverändert erscheinen, sind die durch skalare Kopplungen mit einander in Verbindung stehenden Ringprotonen von D-Pal(3)³ ($^3J_{\text{HH}}$) im Falle des Trifluoracetats drastisch zu höheren ppm-Werten verschoben (Tiefelfeldverschiebung). Es muss daher davon ausgegangen werden, dass der Aminosäure-Rest D-Pal(3)³ in der Probe des Teverelix-Trifluoracetates protoniert und damit positiv geladen vorliegt, was aufgrund des sehr niedrigen pK_S -Wertes von Trifluoressigsäure auch durchaus erklärbar ist.

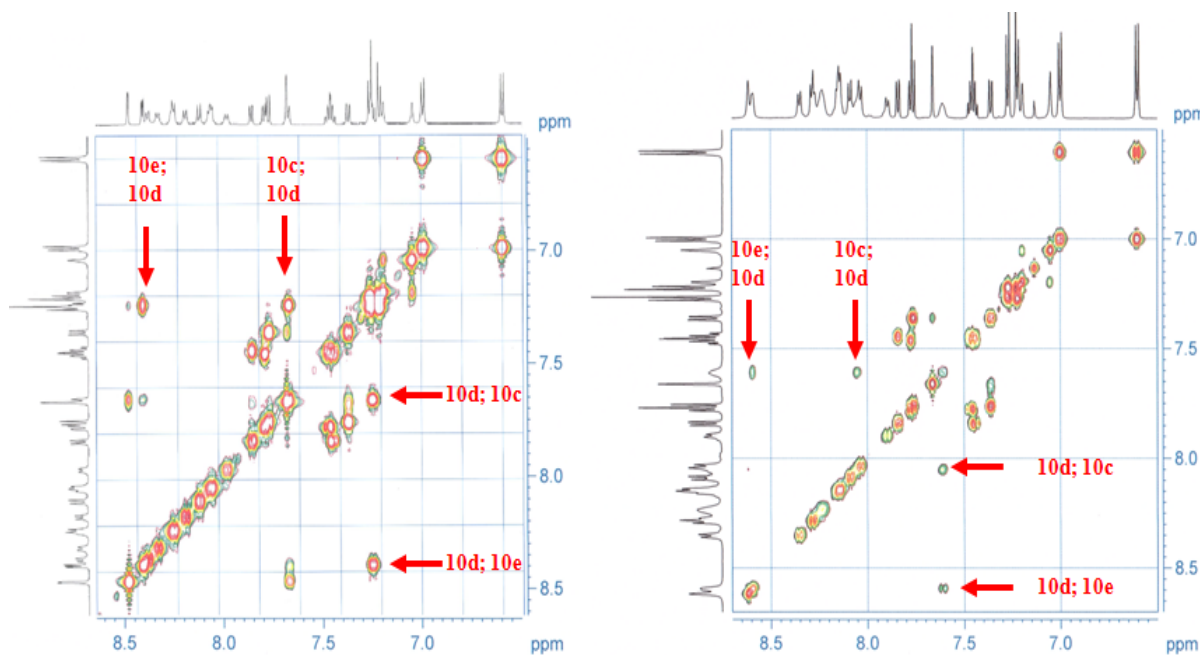


Abb. 62: Vergleich der $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-Spektren von Teverelix-Acetat (links) und Teverelix-Trifluoracetat (rechts) in $\text{DMSO}-d_6$ im Bereich der aromatischen ^1H -Signale; rot markiert: verschobene Kreuzpeaks von D-Pal(3)³

Die entsprechenden Zuordnungstabellen der ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -Signale von Teverelix-Acetat und Teverelix-Trifluoracetat können dem Anhang in Abschnitt 10.1.3 in Form der Tabellen A9 - A12 entnommen werden.

4.1.4.4 3D-Strukturen von Cetrorelix-Acetat

Zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von GnRH-Antagonisten aus NMR-Daten werden Abstandsinformationen unter Ausnutzung des Kern-Overhauser-Effektes (NOE) ermittelt. Die für die Ermittlung dieser Abstandsinformationen erforderliche Integration der Kreuzpeaks erfolgt dabei stets in $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY-Spektren. Darüber hinaus werden immer auch $^1\text{H}/^1\text{H}$ -ROESY-Spektren der einzelnen Proben aufgenommen, um Kreuzpeaks, welche durch 3-Spin-Effekte zustande kommen, von der Berechnung ausschließen zu können. Unter den optimierten Aufnahmebedingungen werden solche 3-Spin-Effekte zwar nur in geringem Ausmaß detektiert, Abb. 63 zeigt jedoch exemplarisch für den Ac-D-Nal(2)¹-Rest von Cetrorelix-Acetat in DMSO-d₆ Kreuzpeaks in einem $^1\text{H}/^1\text{H}$ -ROESY-Spektrum, die durch Spindiffusion zustande kommen.

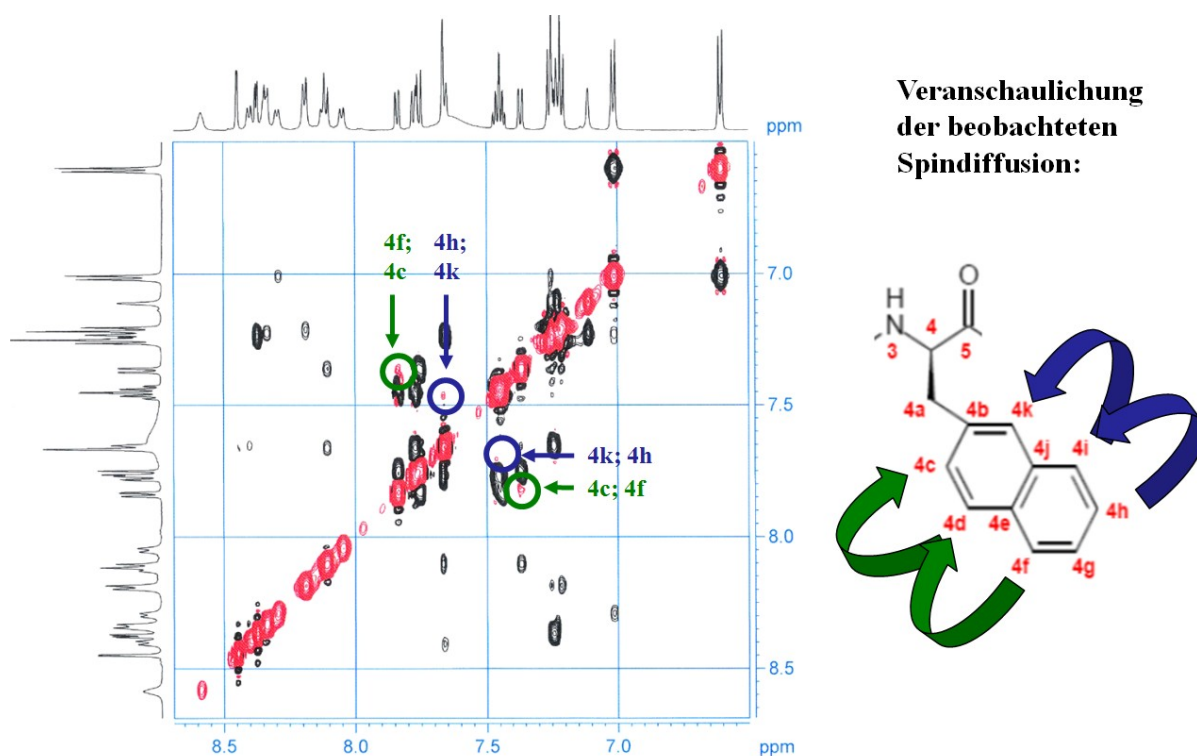


Abb. 63: Ausschnitt aus einem $^1\text{H}/^1\text{H}$ -ROESY-Spektrum zur Veranschaulichung der auftretenden Spindiffusion zwischen verschiedenen ^1H -Kernen des Naphthyl-Rings von Ac-D-Nal(2)¹ von Cetrorelix-Acetat in DMSO-d₆

Der in Abb. 63 sichtbare Kontakt zwischen den ^1H -Kernen in Position 4c und 4f bzw. zwischen den ^1H -Kernen in Position 4h und 4k, der auch in dem korrespondierenden $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum auftritt, ist nicht auf eine direkte dipolare Kopplung zwischen den jeweils genannten Kernen zurückzuführen, sondern geschieht vermittelt über den ^1H -Kern in

Position 4d bzw. im zweiten Fall in Position 4i, wie aus dem in Abb. 63 durch unterschiedliche Farben indizierten Phasenverhalten dieser Signale eindeutig klar wird. Eine einfache dipolare Kopplung führt zu einem Vorzeichenwechsel des resultierenden Signals im entsprechenden $^1\text{H}/^1\text{H}$ -ROESY-Spektrum, was in der vorliegenden Darstellung farblich durch einen Übergang von rot für die Diagonalpeaks zu schwarz für die entsprechenden Kreuzpeaks wiedergegeben wird. Erfolgt vor der Detektion eine weitere Übertragung durch dipolare Kopplung, führt der erneute Vorzeichenwechsel zu einem den Diagonalpeaks phasengleichen und daher ebenfalls rot dargestellten Verhalten (vgl. Abschnitt 1.3.3).

Die 3D-Strukturberechnung mithilfe des in Abschnitt 3.10 erläuterten Verfahrens ergibt im Falle von Cetrorelix-Acetat in DMSO-d_6 die in Abb. 64 dargestellte Struktur. Dabei ist im rechten Teil der Abbildung das Peptidrückgrat-Strukturbündel der final berechneten Modellstrukturen zu sehen, wohingegen im linken Teil der Abbildung allein das Peptidrückgrat der aus diesem Strukturbündel gemittelten Modellstruktur abgebildet ist.

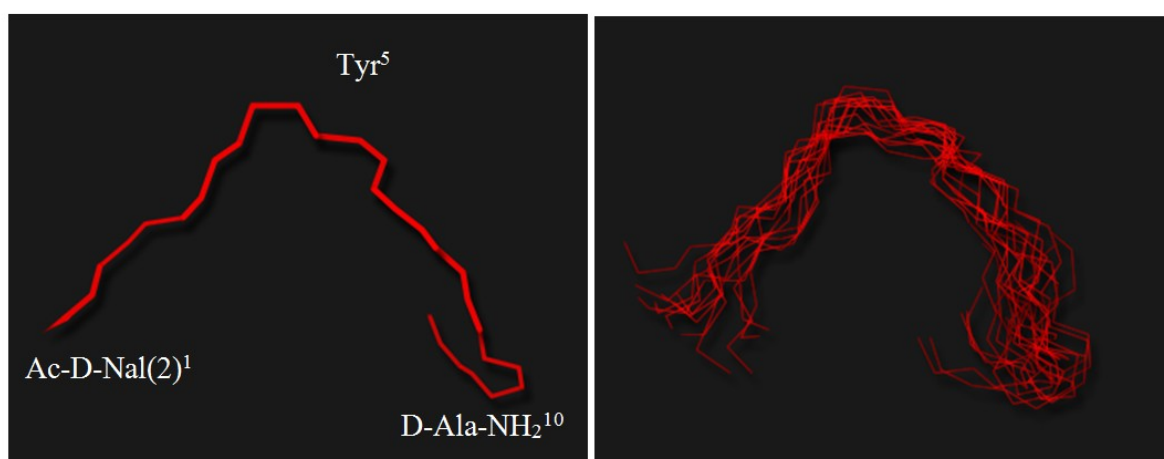


Abb. 64: Ergebnis der NOE-basierten 3D-Strukturbestimmung von Cetrorelix-Acetat in DMSO-d_6 ; links: gemittelte, finale Rückgratstruktur; rechts: finales Strukturbündel

Offensichtlich weist die ermittelte Struktur zwei weitgehend gestreckt vorliegende Rückgratabschnitte auf, welche im Bereich von Tyr⁵ durch eine deutliche Krümmung voneinander getrennt werden. Aus dem abgebildeten Strukturbündel geht hervor, dass die Schärfe der Bestimmung im unmittelbaren Bereich um den Tyr⁵-Rest herum recht hoch ist, während die Atomlagen der Rückgratabschnitte in unmittelbarer Nähe zum N-Terminus bzw. zum C-Terminus des Peptides einer relativ großen Streuung unterliegen und daher zu einer Aufweitung des Strukturbündels führen. Dieser Effekt ist dadurch zu erklären, dass aufgrund der gestreckten Konformation die terminalen Aminosäure-Reste nur Kontakte zu unmittelbar

benachbarten Resten aufweisen und daher ihre exakte Position im Verhältnis zum Rest der Struktur nicht genau erfasst werden kann. Der maximal in einem $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY noch auswertbare Abstand zwischen zwei ^1H -Kernen liegt bei ca. 5,5 Å. Größere Abstände sind unter den vorliegenden Bedingungen nicht messbar.

Die wesentlichen Parameter zur statistischen Bewertung dieses Strukturergebnisses sind in Tabelle 23 zusammengestellt. Besondere Bedeutung kommt hierbei dem Wert für den *Backbone RMSD* zu, welcher ein Maß für die Streuung darstellt, die im Rahmen der Berechnung bei der Bestimmung der Atompositionen des Peptidrückgrates auftritt. Der hierbei erhaltene Wert von 1,43 Å ist recht hoch, jedoch für ein gestrecktes Konformer durchaus aussagekräftig.

Tabelle 23: Zusammenstellung statistischer Kenngrößen des Ergebnisses der 3D-Strukturberechnung von Cetrorelix-Acetat in DMSO- d_6

Parameter	Wert	Parameter	Wert
Anzahl finaler Strukturmodelle	20	Anzahl NOE restraints	59
Target function [Å ²]	656,26 ± 0,13	- davon innerhalb derselben Seitenkette	15 (25,42 %)
Backbone RMSD [Å]	1,43 ± 0,46	- davon sequentiell ($ i-j = 1$)	21 (35,59 %)
Heavy atom RMSD [Å]	2,66 ± 0,48	- davon medium-range ($2 \leq i-j \leq 4$)	21 (35,59 %)
Anzahl zugeordneter Kreuzpeaks	153	- davon long-range ($5 \leq i-j $)	2 (3,39 %)

Bei Betrachtung der Verteilung der *NOE restraints* fällt auf, dass kaum Kontakte zwischen ^1H -Kernen beobachtet werden, die weit voneinander entfernt liegen, was wiederum angesichts der in Abb. 64 dargestellten, gestreckten Struktur nicht weiter verwunderlich ist.

Abb. 65 gibt einen Überblick über die Verteilung der *NOE restraints* dieser Strukturberechnung auf die einzelnen Aminosäure-Reste von Cetrorelix. Es ist besonders auffällig, dass die Anzahl der im Spektrum beobachteten Kontakte in der Mitte der Sequenz besonders hoch ist und in Richtung der beiden Termini abnimmt. Dieser Effekt korreliert mit der in Abb. 64 erkennbaren Krümmung des Peptides im Bereich des Tyr⁵-Restes, welche mit zahlreichen Interaktionen der Seitenketten in diesem Bereich einhergeht. Die besonders geringe Anzahl an Kontakten von Ser⁴ ist schlicht und einfach auf die begrenzte Größe dieser Aminosäure und damit einhergehend auf die geringe Anzahl an ^1H -Kernen zurückzuführen, die mit weiteren Resten wechselwirken können.

Eine detaillierte Übersicht darüber, welche Aminosäurereste miteinander in Kontakt stehen, ist in Abb. 66 dargestellt.

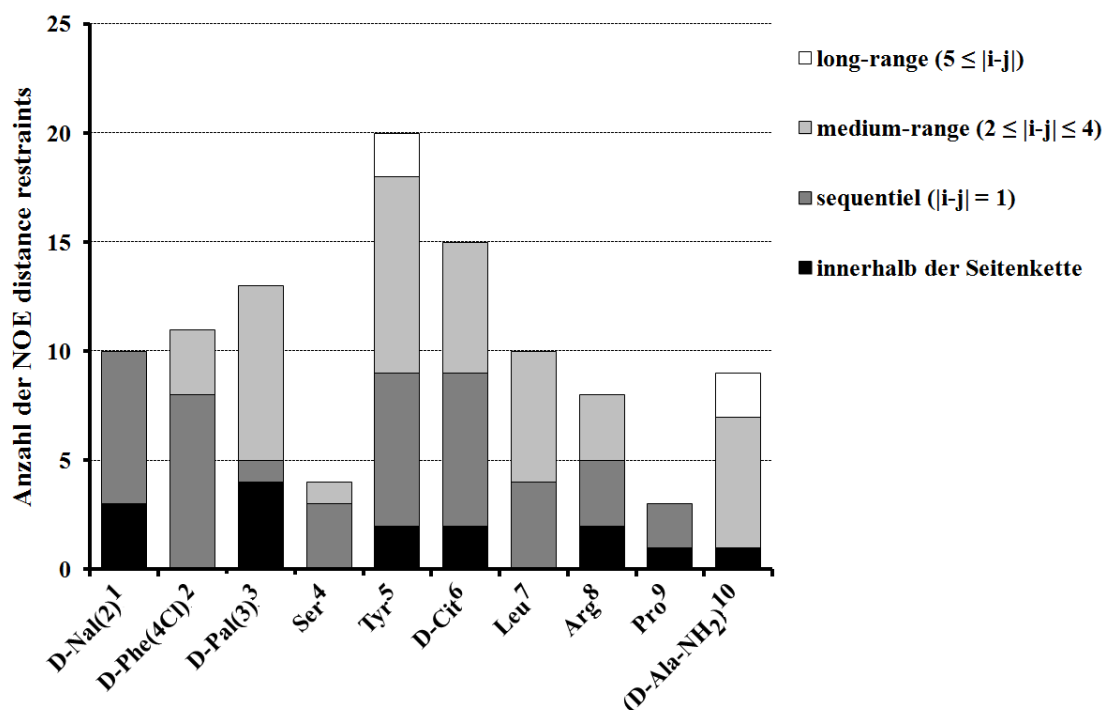


Abb. 65: Verteilung der NOE restraints der 3D-Strukturberechnung von Cetrorelix-Acetat in DMSO-d₆ auf die einzelnen Aminosäure-Reste des Peptides

(D-Ala-NH ₂) ¹⁰					2	1	> 2	1		1
Pro ⁹								2	1	
Arg ⁸					1	1	1	2	2	1
Leu ⁷					2	> 2		1		> 2
D-Cit ⁶			> 2		> 2	2	> 2	1		1
Tyr ⁵		2	> 2	> 2	2	> 2	2	1		2
Ser ⁴		1			> 2					
D-Pal(3) ³		1	> 2		> 2	> 2				
D-Phe(4Cl) ²	> 2		1	1	2					
Ac-D-Nal(2) ¹	> 2	> 2								
	Ac-D-Nal(2) ¹	D-Phe(4Cl) ²	D-Pal(3) ³	Ser ⁴	Tyr ⁵	D-Cit ⁶	Leu ⁷	Arg ⁸	Pro ⁹	(D-Ala-NH ₂) ¹⁰

Abb. 66: NOE-Kontaktübersicht für die 3D-Strukturberechnung von Cetrorelix-Acetat in DMSO-d₆

Aus Abb. 66 wird auf den ersten Blick ersichtlich, dass ein Großteil der Kontakte zwischen Aminosäure-Resten bestehen, die sequentiell nah beieinander liegen, wie es für eine weitgehend gestreckte Konformation auch zu erwarten ist. Davon abweichend steht jedoch der C-terminale Aminosäure-Rest D-Ala-NH₂¹⁰ mit einer ganzen Reihe an Resten in Kontakt, die teilweise bis zu 5 Positionen in der Sequenz entfernt liegen, was sich in der finalen Struktur aus Abb. 64 in Form einer Schleife im C-terminalen Bereich des Peptides äußert. Abb. 67 zeigt eine Detailansicht der finalen Peptidstruktur unter Berücksichtigung der Seitenketten im angesprochenen Sequenzabschnitt. Dabei wird deutlich, dass die Formierung der auftretenden Schleife des Peptidrückgrates durch eine Interaktion des amidierten C-Terminus mit dem Peptidrückgrat im Bereich von Tyr⁵ und D-Cit⁶ hervorgerufen wird. Einen wesentlichen Beitrag zur Stabilisierung dieser Struktur leisten dabei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der terminalen Amid-Einheit und den Peptidbindungen zwischen Tyr⁵ und D-Cit⁶, sowie zwischen D-Cit⁶ und Leu⁷.

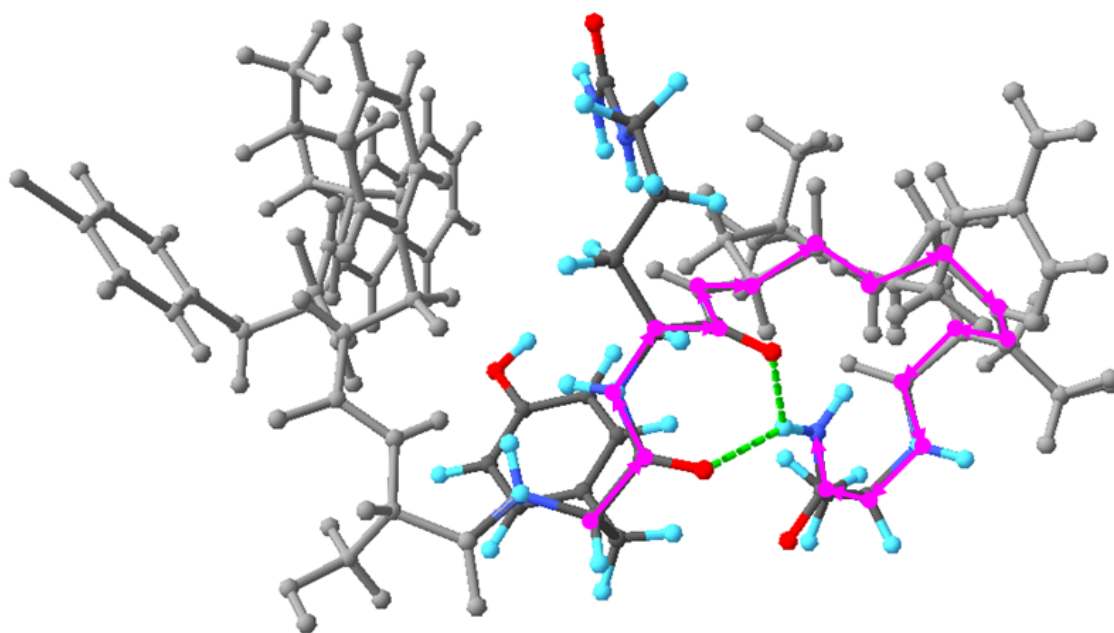


Abb. 67: Detailansicht der berechneten 3D-Struktur von Cetrorelix-Acetat in DMSO-d₆ zur Veranschaulichung der Wechselwirkung zwischen dem amidierten Aminosäure-Rest D-Ala-NH₂¹⁰ am C-Terminus des Peptides und dem Peptidrückgrat im Bereich von Tyr⁵ und D-Cit⁶; Peptidrückgrat im Bereich der resultierenden Schleife violett dargestellt und ausgebildete Wasserstoffbrücken grün

Desweiteren fällt in Abb. 66 ein intensiver Kontakt zwischen D-Pal(3)³ und D-Cit⁶ ins Auge. Dieser Kontakt wird in Abb. 68 in Detailansicht veranschaulicht. Dabei ist klar ersichtlich, dass sich beide Aminosäure-Reste mit einer großen Wechselwirkungsfläche aneinander

lagern. Diese Zusammenlagerung stellt eine wesentliche Ursache für die in Abb. 64 beobachtete Krümmung des Peptidrückgrates im Bereich des Tyr⁵-Restes dar.



Abb. 68: Detailansicht der berechneten 3D-Struktur von Cetrorelix-Acetat in DMSO-d₆ zur Veranschaulichung der Wechselwirkung zwischen D-Pal(3)³ und D-Cit⁶ (beide Reste rot hervorgehoben)

Basierend auf den Erkenntnissen aus Abschnitt 4.1.2.3 zum Aggregationsphasenverhalten von Cetrorelix-Acetat in DMSO/Wasser-Gemischen wird die NMR-spektroskopische Untersuchung der 3D-Struktur dieses GnRH-Antagonisten in DMSO-d₆/D₂O-Gemischen mit Mischungs-Verhältnissen von 70/30 (v/v) und 45/55 (v/v) wiederholt. Abb. 69 visualisiert die veränderte Rückgratstruktur im erstgenannten DMSO-d₆/D₂O-Gemisch.

Die beobachtete Struktur weist erhebliche Gemeinsamkeiten mit der in Abb. 64 dargestellten Struktur des Peptides in reinem DMSO-d₆ auf. Erneut werden zwei ausgestreckte Sequenzabschnitte beobachtet, die durch eine markante Krümmung des Peptid-Rückgrates im Bereich des Tyr⁵-Restes voneinander getrennt werden. Der daraus resultierende Winkel zwischen den gestreckten Sequenzabschnitten ist in Gegenwart von 30 Vol.-% D₂O jedoch erheblich spitzer, wodurch sich beide Abschnitte stärker einander annähern. Das zugehörige Strukturbündel erscheint zudem in allen Sequenzabschnitten sehr viel dichter, was auf eine deutlich geringere Streuung bei der Beschreibung der Atompositionen hinweist.

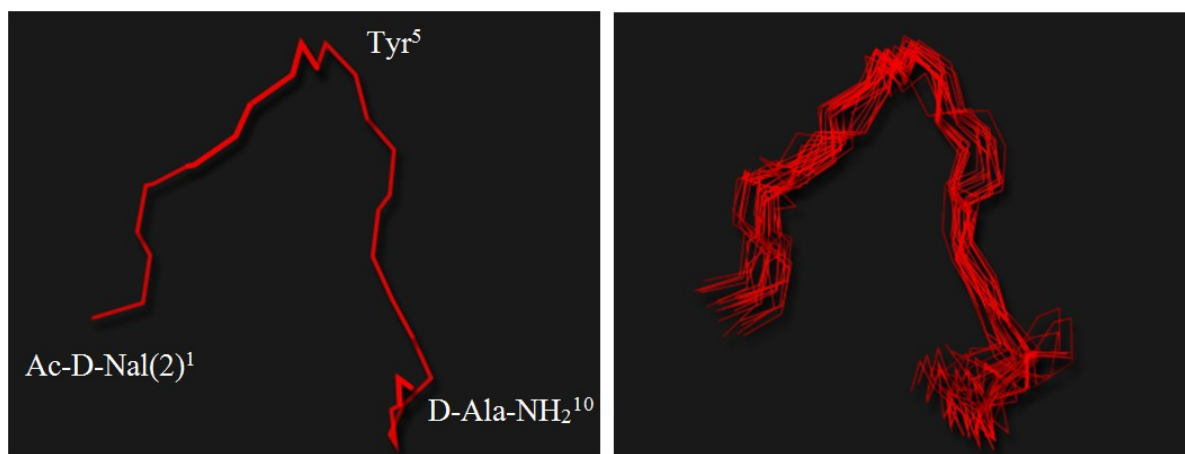


Abb. 69: Ergebnis der NOE-basierten 3D-Strukturbestimmung von Cetrorelix-Acetat in DMSO- d_6 /D $_2$ O im Verhältnis 70/30 (v/v) ; links: gemittelte, finale Rückgratstruktur; rechts: finales Strukturbündel

Der letztgenannte Aspekt wird auch durch die in Tabelle 24 zusammengestellten statistischen Kennwerte dieses Berechnungsergebnisses untermauert. Der *Backbone RMSD* ist mit 0,71 Å sehr gering und die Anzahl der im Spektrum erfassbaren Kontakte ist erheblich höher als in reinem DMSO- d_6 , was in Kombination nichts anderes bedeutet, als dass durch die zusätzliche Gegenwart von D $_2$ O eine stärkere intramolekulare Assoziation verschiedener Aminosäure-Reste hervorgerufen wird, die zu einer größeren Anzahl auswertbarer Kontaktinformationen und dadurch ebenfalls zu einer exakteren Bestimmung der Atompositionen führt.

Tabelle 24: Zusammenstellung statistischer Kenngrößen des Ergebnisses der 3D-Strukturberechnung von Cetrorelix-Acetat in DMSO- d_6 /D $_2$ O im Verhältnis 70/30 (v/v)

Parameter	Wert
Anzahl finaler Strukturmodelle	20
Target function [Å ²]	656,83 ± 0,21
Backbone RMSD [Å]	0,71 ± 0,17
Heavy atom RMSD [Å]	1,37 ± 0,54
Anzahl zugeordneter Kreuzpeaks	197

Parameter	Wert
Anzahl NOE restraints	113
- davon innerhalb derselben Seitenkette	38 (33,63 %)
- davon sequentiell ($ i-j = 1$)	28 (24,78 %)
- davon medium-range ($2 \leq i-j \leq 4$)	32 (28,32 %)
- davon long-range ($5 \leq i-j $)	15 (13,27 %)

Bei einem Blick auf die in Abb. 70 dargestellte Verteilung der *NOE distance restraints* auf die einzelnen Aminosäure-Reste wird insbesondere im Vergleich zu Abb. 65 deutlich, dass diese zusätzlichen Kontakte zu großen Teilen unter Beteiligung der stark hydrophoben Reste im N-terminalen Sequenzbereich zustande kommen. Eine solche Verstärkung

intramolekularer Zusammenlagerungen, die offensichtlich durch hydrophobe Effekte getrieben wird, ist bei der Zugabe von D₂O durchaus plausibel. Aus der Abbildung geht weiterhin hervor, dass alle Aminosäure-Reste außer Ser⁴ und Tyr⁵ in diesem Solvensgemisch *long-range*-Kontakte zu anderen Resten aufweisen, was die intensive Interaktion der beiden durch ebendiese Aminosäuren getrennten Sequenzabschnitte verdeutlicht.

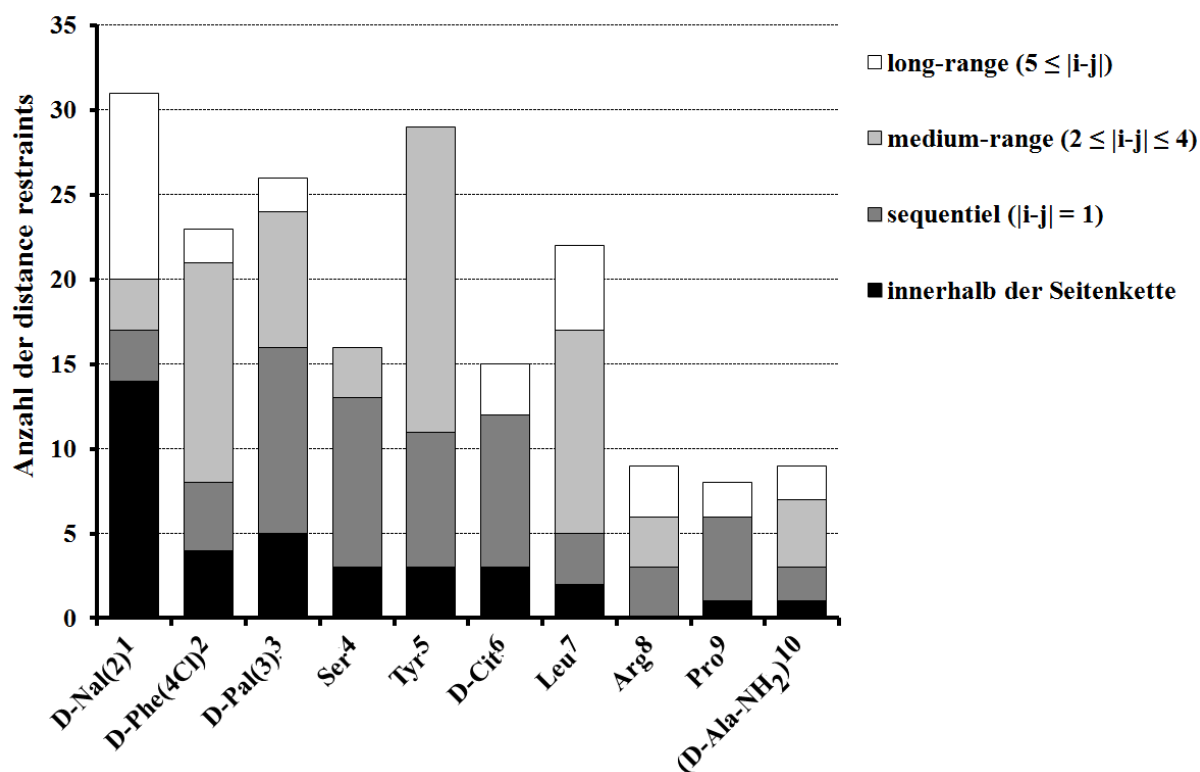


Abb. 70: Verteilung der NOE restraints der 3D-Strukturberechnung von Cetrorelix-Acetat in DMSO-d₆/D₂O (70/30 (v/v)) auf die einzelnen Aminosäure-Reste des Peptides

Eine Übersicht über die konkret beobachteten Kontakte zwischen den verschiedenen Aminosäure-Resten gibt Abb. 71. Die auffällig hohe Anzahl an Kontakten abseits der Sequenz-Diagonalen ist charakteristisch für eine dicht zusammengefaltete Konformation. Besonders markant ist das umfangreiche Interaktionsgeflecht zwischen dem Ac-D-Nal(2)¹-Rest und dem benachbarten D-Phe(4Cl)²-Rest, sowie den Aminosäure-Resten im Sequenzabschnitt Tyr⁵ bis Pro⁹, welches offenkundig in den meisten Fällen durch zahlreiche Kreuzpeaks bestätigt wird.

Dieses Interaktionsnetz ist in Abb. 72 im Detail dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass die hydrophoben Bereiche der entsprechenden Aminosäuren eine Art konkave Tasche bilden, in welche sich die Naphthyl-Seitenkette des Ac-D-Nal(2)¹-Restes einbettet. Die Triebkraft dieser intramolekularen Assoziation lässt sich daher eindeutig mit hydrophoben Effekten erklären.

(D-Ala-NH ₂) ¹⁰			2				1	> 2	2	1
Pro ⁹	2							> 2	1	2
Arg ⁸	> 2								> 2	> 2
Leu ⁷	> 2	2	> 2	1	> 2	> 2	2			1
D-Cit ⁶	> 2				> 2	> 2	> 2			
Tyr ⁵	> 2	> 2	1	2	> 2	> 2	> 2			
Ser ⁴		2	> 2	> 2	2		1			
D-Pal(3) ³		1	> 2	> 2	1		> 2			2
D-Phe(4Cl) ²	> 2	> 2	1	2	> 2		2			
Ac-D-Nal(2) ¹	> 2	> 2			> 2	> 2	> 2	> 2	2	
	Ac-D-Nal(2) ¹	D-Phe(4Cl) ²	D-Pal(3) ³	Ser ⁴	Tyr ⁵	D-Cit ⁶	Leu ⁷	Arg ⁸	Pro ⁹	(D-Ala-NH ₂) ¹⁰

Abb. 71: NOE-Kontaktübersicht für die 3D-Strukturberechnung von Cetrorelix-Acetat in DMSO-d₆/D₂O im Verhältnis 70/30 (v/v)

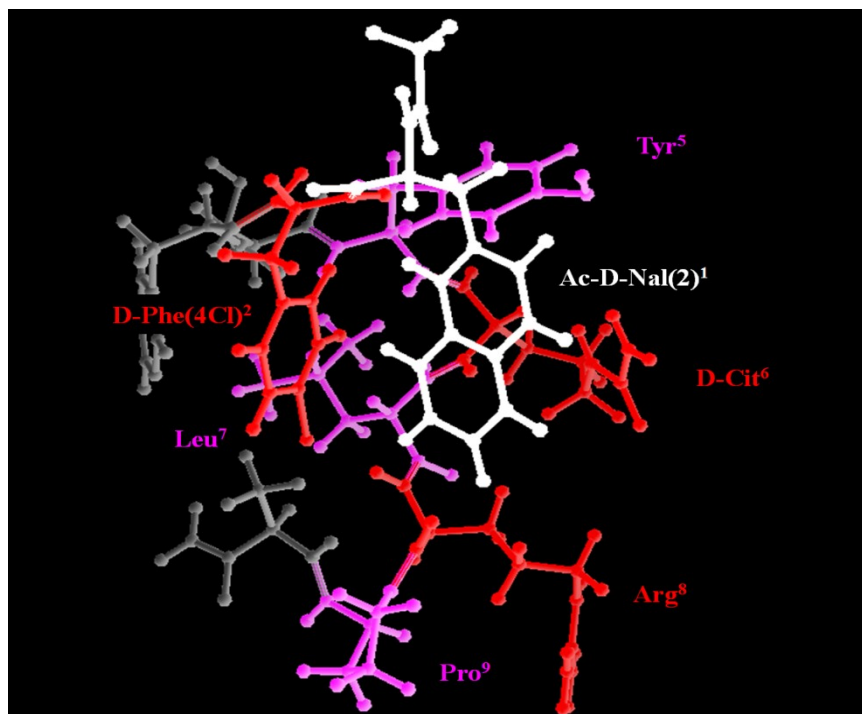


Abb. 72: Detailansicht der berechneten 3D-Struktur von Cetrorelix-Acetat in DMSO-d₆/D₂O im Verhältnis 70/30 (v/v) zur Veranschaulichung des Interaktionsnetzes von Ac-D-Nal(2)¹ in einer aus den rot bzw. violett dargestellten Aminosäure-Resten gebildeten, konkaven Tasche

Für die letzte Stufe dieser Untersuchungsserie wird der D₂O-Gehalt nochmals erhöht, sodass er 55 Vol.-% beträgt. Die Konformation des unter diesen Bedingungen ermittelten Peptid-Rückgrates ist in Abb. 73 zu sehen. Dabei setzt sich der bereits beobachtete Trend fort, nach welchem zwei gestreckte Sequenzabschnitte durch eine Krümmung des Rückgrates voneinander separiert werden und der Winkel zwischen beiden Abschnitten bei Erhöhung des D₂O-Gehaltes spitzer wird.

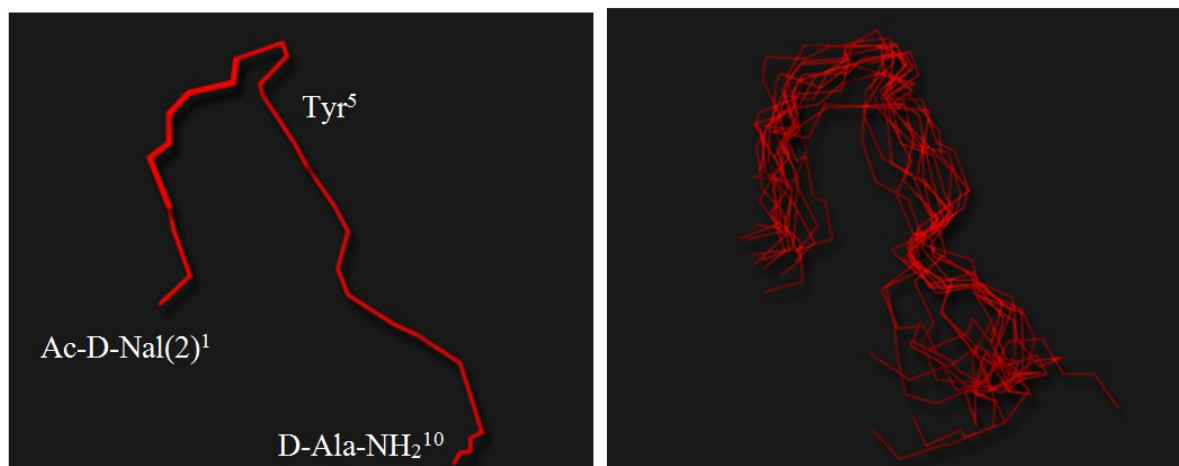


Abb. 73: Ergebnis der NOE-basierten 3D-Strukturbestimmung von Cetorelix-Acetat in DMSO-d₆/D₂O im Verhältnis 45/55 (v/v) ; links: gemittelte, finale Rückgratstruktur; rechts: finales Strukturbündel

Die statistischen Kennwerte dieses Berechnungsergebnisses sind Tabelle 25 zu entnehmen. In diesem Fall weist der hohe Wert des *Backbone RMSD* von 2,27 Å auf einen hohen Grad an Unsicherheit bei den bestimmten Atompositionen hin, was auch anhand der Aufweitung des in Abb. 73 abgebildeten Strukturbündels erkennbar ist.

Tabelle 25: Zusammenstellung statistischer Kenngrößen des Ergebnisses der 3D-Strukturberechnung von Cetorelix-Acetat in DMSO-d₆/D₂O im Verhältnis 45/55 (v/v)

Parameter	Wert	Parameter	Wert
Anzahl finaler Strukturmodelle	20	Anzahl NOE restraints	70
Target function [Å ²]	656,17 ± 0,18	- davon innerhalb derselben Seitenkette	32 (45,71 %)
Backbone RMSD [Å]	2,27 ± 0,35	- davon sequentiell (i-j = 1)	12 (17,14 %)
Heavy atom RMSD [Å]	2,92 ± 1,05	- davon medium-range (2 ≤ i-j ≤ 4)	13 (18,57 %)
Anzahl zugeordneter Kreuzpeaks	136	- davon long-range (5 ≤ i-j)	13 (18,57 %)

Die Erkenntnisse zu Anzahl und Verteilung der einzelnen *NOE distance restraints* unterscheiden sich nicht gravierend von denen, die für das DMSO- d_6 /D $_2$ O-Gemisch mit einem Verhältnis von 70/30 (v/v) erläutert wurden. Daher wird auf eine detaillierte Darstellung an dieser Stelle verzichtet. Die korrespondierenden Graphiken können jedoch dem Anhang in Abschnitt 10.2.1 entnommen werden.

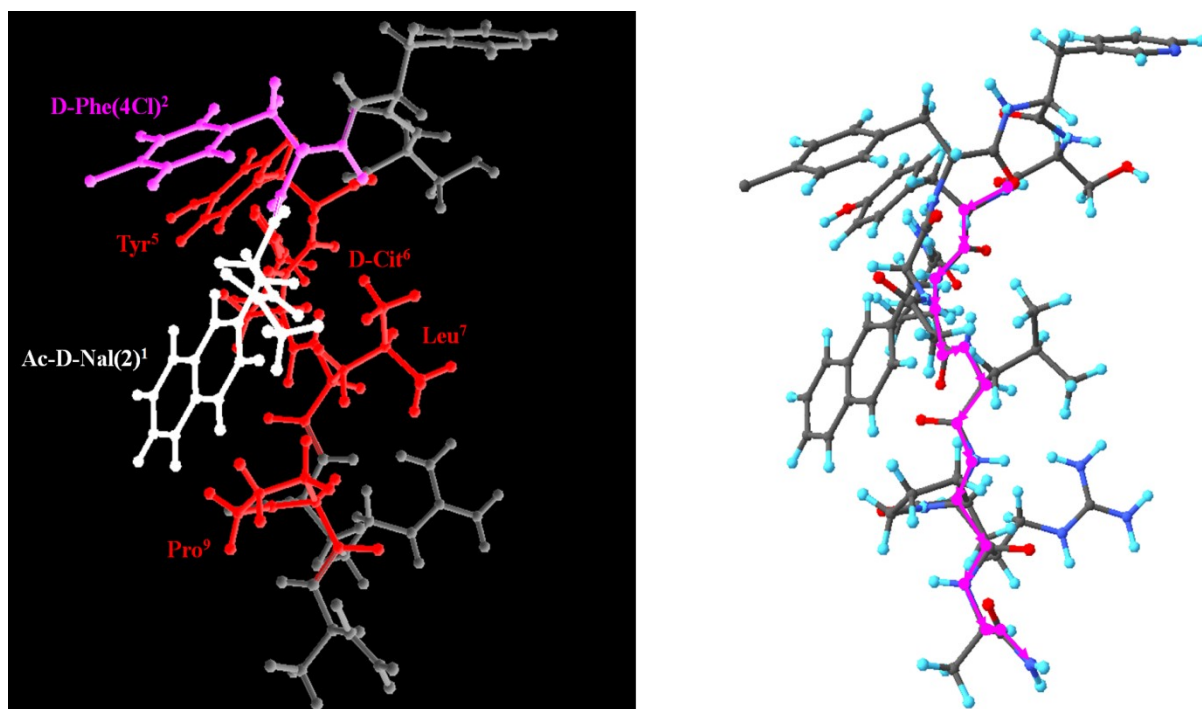


Abb. 74: Detailansichten zur Verdeutlichung der gestreckten Konformation des Peptid-Rückgrates von Cetorelix-Acetat in DMSO- d_6 /D $_2$ O (45/55 (v/v)); links: interagierende Aminosäure-Reste; rechts: Verlauf des Peptidrückgrates (violett hervorgehoben)

Bemerkenswert ist der extrem gestreckte Verlauf des Peptidrückgrates in Abb. 73 auf der C-terminalen Seite des Tyr⁵-Restes. Diese Streckung wird in der Detailansicht von Abb. 74 unter Berücksichtigung der entsprechenden Seitenketten von Cetorelix illustriert. Der Naphthyl-Rest von Ac-D-Nal(2)¹ fungiert wiederum als zentraler Wechselwirkungspartner für die Seitenketten der Aminosäure-Reste zwischen Tyr⁵ und Pro⁹. Interessanterweise führt diese Gruppierung einer solch hohen Anzahl an Seitenketten um einen einzelnen Wechselwirkungspartner jedoch nicht zu einer globulären Struktur, sondern ganz im Gegenteil zu einer extrem gestreckten Konformation, was eine wesentliche Grundvoraussetzung für die Ausbildung von intermolekularen β -Faltblatt-Strukturen bildet.

4.1.4.5 3D-Strukturen von Ozarelix-Acetat

Die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Ozarelix wird dadurch erschwert, dass dieser GnRH-Antagonist, wie in Abschnitt 4.1.4.2 besprochen, in allen untersuchten Chargen in zwei verschiedenen Konfigurationsisomeren bezüglich der Peptidbindung zwischen Ser⁴ und Tyr(Me)⁵ vorliegt. Dieser gravierende Unterschied in der kovalenten Struktur des Peptides bewirkt, dass in derselben Probe stets mindestens zwei verschiedene Monomere nebeneinander vorliegen. Deren separate Strukturberechnung aus ein und demselben NOESY-Spektrum ist nur für diejenigen Kontakte mit Sicherheit möglich, für die zumindest einer der beiden ¹H-Kerne, die über dipolare Kopplung miteinander interagieren, eine chemische Verschiebung aufweist, die spezifisch einer der beiden Isomere zugeordnet werden kann. Dies trifft im Wesentlichen für Kontakte unter Beteiligung der Aminosäure-Reste im Sequenzabschnitt D-Pal(3)³ - Nle⁷ zu (vgl. Abschnitt 4.1.4.2). Für die Kontakte zwischen den Resten in unmittelbarer Nähe zu N- oder C-Terminus ist daher eine größere Unsicherheit gegeben, da in diesem Bereich nicht geklärt werden kann, zu welchem der Isomere ein Kontakt gehört.

Abb. 75 stellt die gemittelten Rückgratstrukturen für beide Isomere einander gegenüber. Dabei ergibt sich ein bedeutender Unterschied zwischen den Isomeren. Für den Fall einer *trans*-konfigurierten Peptidbindung zwischen Ser⁴ und Tyr(Me)⁵ zeigt sich eine helikale Struktur über die gesamte Länge der Peptidkette, wohingegen bei einer *cis*-konfigurierten Peptidbindung an dieser Stelle analog zu den für Cetorelix bestimmten Strukturen eine Konformation mit zwei gestreckten Abschnitten resultiert, die im Bereich des Tyr(Me)⁵-Restes durch eine Krümmung des Rückgrates voneinander getrennt vorliegen.

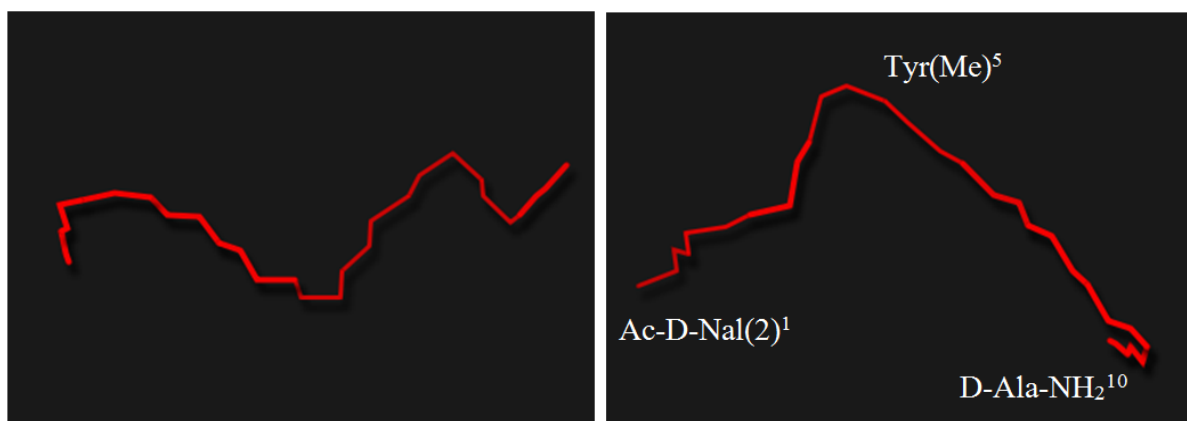


Abb. 75: Ergebnis der NOE-basierten 3D-Strukturbestimmung von Ozarelix-Acetat in DMSO-d₆; links: Rückgratstruktur bei *trans*-konfigurierter Peptidbindung zwischen Ser⁴ & Tyr(Me)⁵; rechts: Rückgratstruktur bei *cis*-konfigurierter Peptidbindung zwischen Ser⁴ & Tyr(Me)⁵

4 Ergebnisse

Ein Vergleich der für die verschiedenen Isomere von Ozarelix erhaltenen statistischen Kennwerte der 3D-Strukturberechnung anhand von Tabelle 26 und Tabelle 27 zeigt, dass bei Vorliegen einer *trans*-konfigurierten Peptidbindung zum einen ca. 10 % mehr Kreuzpeaks im Spektrum erkannt werden und weiterhin davon ausgehend ein höherer Anteil an *medium-range*-Kontakten zugeordnet werden, wie es für eine helikale Struktur auch zu erwarten ist. Der *Backbone RMSD* ist in beiden Fällen etwas hoch, aber noch im aussagekräftigen Bereich.

Tabelle 26: Zusammenstellung statistischer Kenngrößen des Ergebnisses der 3D-Strukturberechnung von Ozarelix-Acetat in DMSO-d₆ bei einer *trans*-Peptidbindung zwischen Ser⁴ & Tyr(Me)⁵

Parameter	Wert
Anzahl finaler Strukturmodelle	20
Target function [Å ²]	678,17 ± 0,19
Backbone RMSD [Å]	1,51 ± 0,69
Heavy atom RMSD [Å]	2,42 ± 0,77
Anzahl zugeordneter Kreuzpeaks	200

Parameter	Wert
Anzahl NOE restraints	85
- davon innerhalb derselben Seitenkette	48 (56,47 %)
- davon sequentiell ($ i-j = 1$)	20 (23,53 %)
- davon medium-range ($2 \leq i-j \leq 4$)	12 (14,12 %)
- davon long-range ($5 \leq i-j $)	5 (5,88 %)

Tabelle 27: Zusammenstellung statistischer Kenngrößen des Ergebnisses der 3D-Strukturberechnung von Ozarelix-Acetat in DMSO-d₆ bei einer *cis*-Peptidbindung zwischen Ser⁴ & Tyr(Me)⁵

Parameter	Wert
Anzahl finaler Strukturmodelle	20
Target function [Å ²]	677,86 ± 0,21
Backbone RMSD [Å]	1,71 ± 0,47
Heavy atom RMSD [Å]	2,44 ± 0,40
Anzahl zugeordneter Kreuzpeaks	180

Parameter	Wert
Anzahl NOE restraints	83
- davon innerhalb derselben Seitenkette	51 (61,45 %)
- davon sequentiell ($ i-j = 1$)	20 (24,10 %)
- davon medium-range ($2 \leq i-j \leq 4$)	9 (10,84 %)
- davon long-range ($5 \leq i-j $)	3 (3,61 %)

Die zugehörigen *NOE distance restraint*-Verteilungen bzw. Kontakt-Übersichten sind in den Abschnitten 10.2.2 und 10.2.3 des Anhangs für beide Isomere abgelegt, werden an dieser Stelle aber nicht detailliert besprochen. Hingegen soll die Aufmerksamkeit noch einmal auf die Beziehung zwischen der Konfiguration der Peptidbindung zwischen Ser⁴ und Tyr(Me)⁵ und der resultierenden Konformation des GnRH-Antagonisten gerichtet werden.

Abb. 76 veranschaulicht die auftretenden Seitenketten-Interaktionen bei Vorliegen einer *trans*-konfigurierten Peptidbindung in der entscheidenden Position. In dieser Anordnung wechselwirkt die Rückgrat-Methylgruppe von Tyr(Me)⁵ mit dem benachbarten Ser⁴-Rest. Der

phenolische Ring liegt dagegen assoziiert mit Ac-D-Nal(2)¹ und Nle⁷ in Form eines hydrophoben Clusters vor, was das Peptid-Rückgrat in eine helikale Windung zwingt.

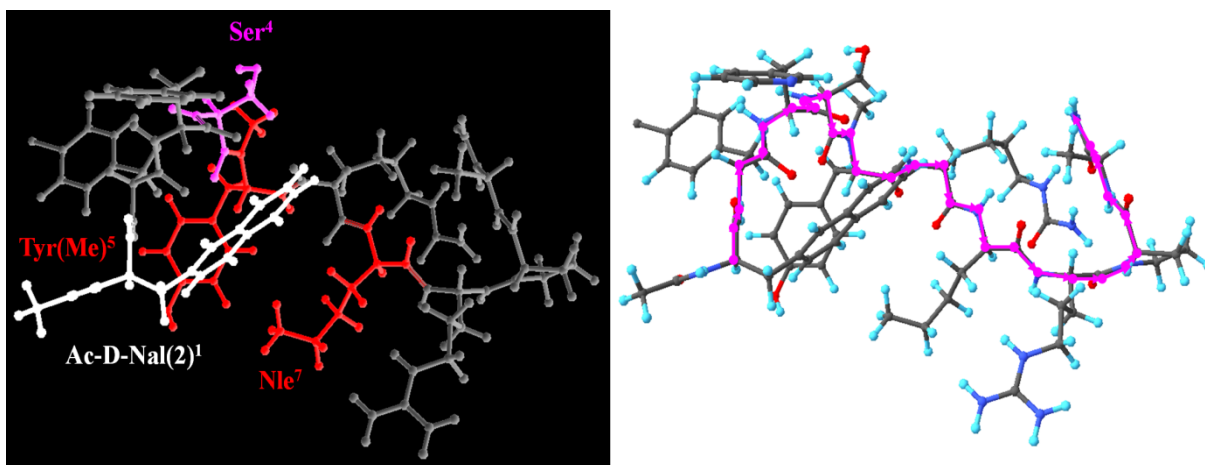


Abb. 76: Detailansichten zur Verdeutlichung der helikalen Konformation des Peptid-Rückgrates von Ozarelix-Acetat in DMSO-d₆ bei einer *trans*-Peptidbindung zwischen Ser⁴ und Tyr(Me)⁵; links: Interaktion des phenolischen Ringes von Tyr(Me)⁵ und der Seitenkette von Nle⁷ mit Ac-D-Nal(2)¹; rechts: Verlauf des Peptidrückgrates (violett hervorgehoben)

Im Gegensatz dazu zeigt Abb. 77 die Konstellation dieser Aminosäure-Reste bei Vorliegen einer *cis*-Peptidbindung zwischen Ser⁴ und Tyr(Me)⁵. In diesem Fall liegen die Seitenketten von Tyr(Me)⁵ und Nle⁷ auf der abgewandten Seite des Peptidrückgrates, können daher nicht mit dem Naphthyl-System von Ac-D-Nal(2)¹ wechselwirken und die helikale Windung kommt nicht zustande.

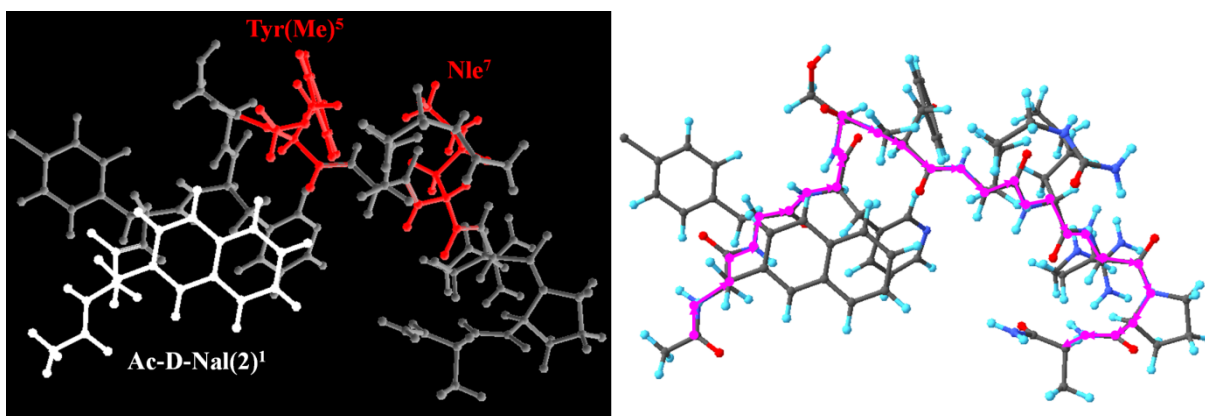


Abb. 77: Detailansichten zur Verdeutlichung der gestreckten Konformation des Peptid-Rückgrates von Ozarelix-Acetat in DMSO-d₆ bei einer *cis*-Peptidbindung zwischen Ser⁴ und Tyr(Me)⁵; links: hydrophobe Interaktion des phenolischen Ringes von Tyr(Me)⁵ und der Seitenkette von Nle⁷ miteinander; rechts: Verlauf des Peptidrückgrates (violett hervorgehoben)

4.1.4.6 3D-Strukturen von Teverelix-Acetat und Teverelix-Trifluoracetat

Eine vergleichende Betrachtung der 3D-Strukturen von Teverelix in seiner Acetat- und seiner Trifluoracetat-Form ist im Gegensatz zu den beiden Isomeren von Ozarelix in separaten Proben möglich, sodass die Einschränkungen bezüglich der Zuordnung der Signale zu den einzelnen Konformeren hier nicht gelten. Wie in Abschnitt 4.1.4.3 demonstriert, unterscheiden sich die beiden Salzformen des GnRH-Antagonisten insbesondere bezüglich der Protonierung der Seitenkette von D-Pal(3)³.

Die ermittelten Konformationen sind in Abb. 78 dargestellt. Im Fall des Trifluoracetates resultiert eine helikale Struktur, wohingegen im Fall des Acetates eine äußerst gestreckte Struktur beobachtet wird. Die gestreckte Konformation weist zwar analog zu Cetrorelix-Acetat eine Krümmung im Rückgrat auf, jedoch erscheint diese in einem stumpferen Winkel und im Verhältnis zum Tyr⁵-Rest C-terminal verschoben.

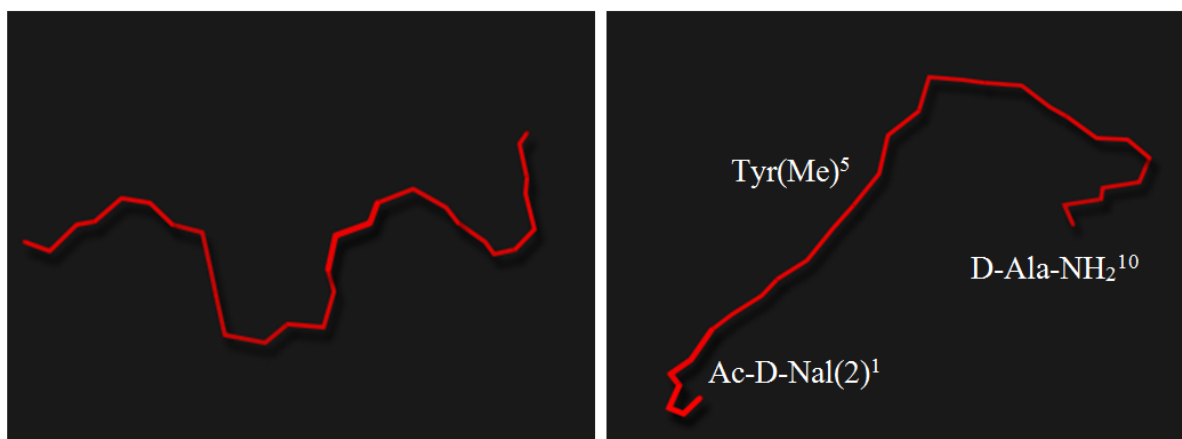


Abb. 78: Ergebnis der NOE-basierten 3D-Strukturbestimmung von Teverelix-Salzen in DMSO-d₆; links: Rückgratstruktur im Fall von Teverelix-Trifluoracetat; rechts: Rückgratstruktur im Fall von Teverelix-Acetat

Die statistischen Kennwerte dieser Berechnungen sind in Tabelle 28 und Tabelle 29 wiedergegeben. Die *Backbone RMSD*-Werte sind in beiden Fällen recht hoch, wobei das Ergebnis der Strukturberechnung des Trifluoracetates eine erheblich geringere Streuung zeigt. Gleichfalls fällt auf, dass für das Trifluoracetat signifikant mehr *medium-range*-Kontakte detektiert werden als für Teverelix-Acetat, was wiederum die helikale Struktur untermauert. In beiden Bestimmungen werden überhaupt keine *long-range*-Kontakte erhalten. Infolgedessen sind die *NOE distance restraint*-Verteilungen und die korrespondierenden Kontaktübersichten vordergründig auf sequentielle Kontakte begrenzt, weshalb an dieser

Stelle auf eine detaillierte Darstellung verzichtet wird. Die entsprechenden Graphiken können jedoch dem Anhang in den Abschnitten 10.2.4 und 10.2.5 entnommen werden.

Tabelle 28: Zusammenstellung statistischer Kenngrößen des Ergebnisses der 3D-Strukturberechnung von Teverelix-Trifluoracetat in DMSO-d₆

Parameter	Wert	Parameter	Wert
Anzahl finaler Strukturmodelle	20	Anzahl NOE restraints	93
Target function [Å ²]	679,67 ± 0,13	- davon innerhalb derselben Seitenkette	57 (61,29 %)
Backbone RMSD [Å]	1,51 ± 0,45	- davon sequentiell (i-j = 1)	27 (29,03 %)
Heavy atom RMSD [Å]	2,61 ± 0,56	- davon medium-range (2 ≤ i-j ≤ 4)	9 (9,68 %)
Anzahl zugeordneter Kreuzpeaks	191	- davon long-range (5 ≤ i-j)	0 (0,00 %)

Tabelle 29: Zusammenstellung statistischer Kenngrößen des Ergebnisses der 3D-Strukturberechnung von Teverelix-Acetat in DMSO-d₆

Parameter	Wert	Parameter	Wert
Anzahl finaler Strukturmodelle	20	Anzahl NOE restraints	91
Target function [Å ²]	679,55 ± 0,22	- davon innerhalb derselben Seitenkette	60 (65,93 %)
Backbone RMSD [Å]	2,23 ± 0,42	- davon sequentiell (i-j = 1)	29 (31,87 %)
Heavy atom RMSD [Å]	4,14 ± 0,55	- davon medium-range (2 ≤ i-j ≤ 4)	2 (2,20 %)
Anzahl zugeordneter Kreuzpeaks	181	- davon long-range (5 ≤ i-j)	0 (0,00 %)

Da ein markanter Unterschied zwischen den beiden Teverelix-Salzen im Protonierungszustand der Seitenkette von D-Pal(3)³ besteht, lohnt ein detaillierter Blick auf die Interaktionen dieses Aminosäure-Restes in den beiden verschiedenen Konformeren. Abb. 79 zeigt die Interaktionen im helikalen Konformer des Teverelix-Trifluoracetates. Auffällig sind hierbei die gegenseitigen Assoziationen von D-Phe(4Cl)² und D-Hcit⁶, sowie von D-Pal(3)³ und Leu⁷. In beiden Fällen können nur unpolare Wechselwirkungen als Triebkraft in Frage kommen, was insbesondere in Hinblick auf den Charakter des protonierten D-Pal(3)³-Restes interessant ist. Diese paarweise Zusammenlagerung von Resten im Abstand von je 4 Sequenzpositionen stabilisiert analog zur Struktur des Ozarelix-Isomers mit *trans*-konfigurierter Peptidbindung zwischen Ser⁴ und Tyr(Me)⁵ eine helikale Windung des Peptid-Rückgrates.

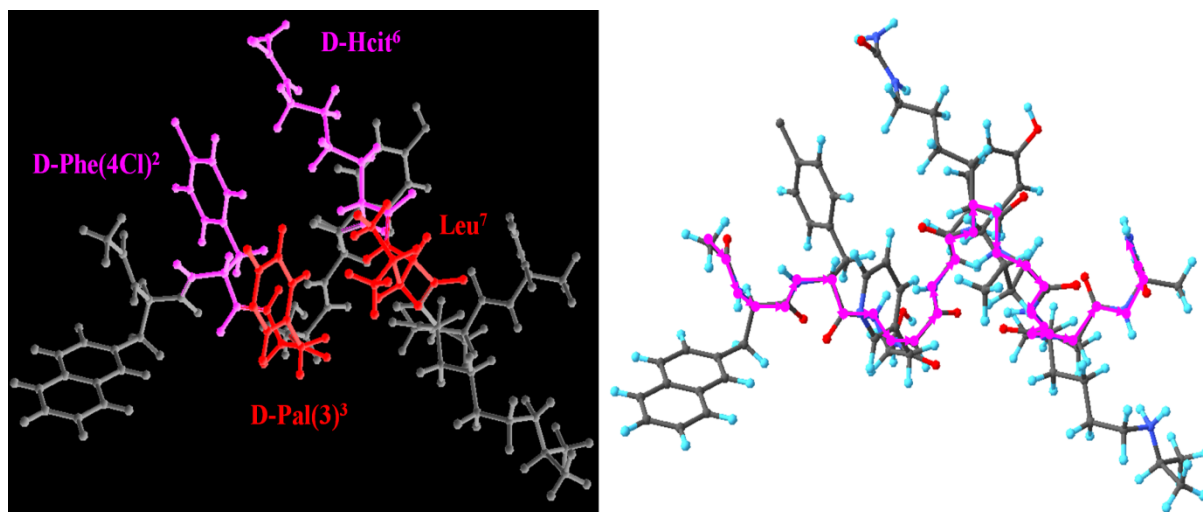


Abb. 79: Detailansichten zur Verdeutlichung der helikalen Konformation des Peptid-Rückgrates von Teverelix-Trifluoracetat in DMSO- d_6 ; links: paarweise Interaktion der gleichfarbig gekennzeichneten Aminosäure-Reste; rechts: Verlauf des Peptidrückgrates (violett hervorgehoben)

Ein kontrastierendes Verhalten wird dagegen in Teverelix-Acetat erkannt. Der deprotonierte Pyridyl-Ring von D-Pal(3)³ ist nur lose mit dem benachbarten D-Phe(4Cl)²-System assoziiert und kann daher keine helikale Windung stabilisieren. Stattdessen wird eine unpolare Wechselwirkung des phenolischen Ringes von Tyr⁵ mit der Isopropyl-Einheit von Lys(iPr)⁸ detektiert. Die beschriebene Konstellation ist in Abb. 80 verdeutlicht.

Die strukturell entscheidende Assoziation des Pyridyl-Ringes mit einer unpolaren Seitenkette wird offensichtlich nur in der protonierten und damit positiv geladenen Form beobachtet.

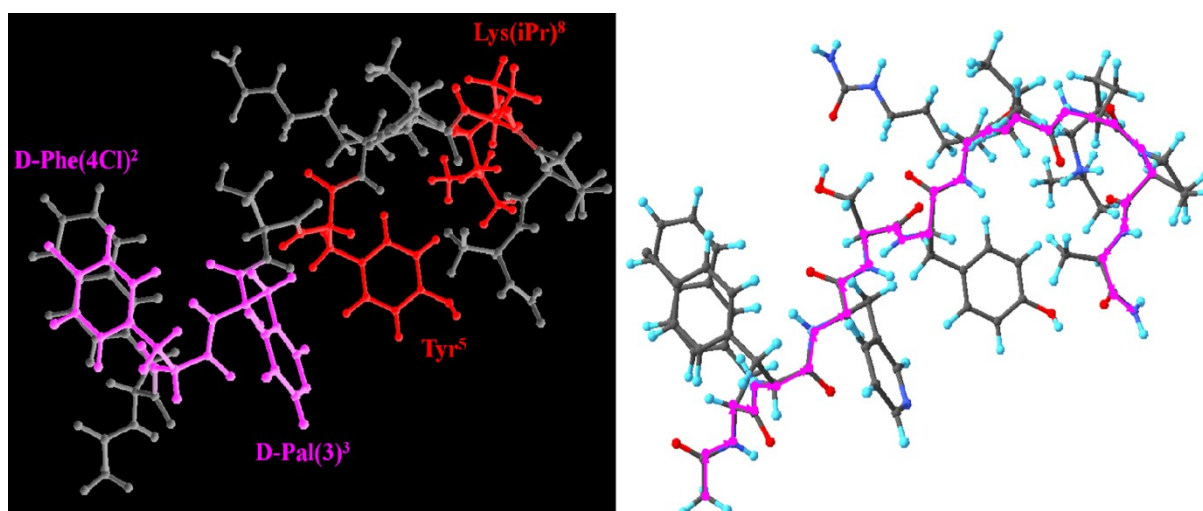


Abb. 80: Detailansichten zur Verdeutlichung der gestreckten Konformation des Peptid-Rückgrates von Teverelix-Acetat in DMSO- d_6 ; links: Interaktionen bestimmter Aminosäure-Reste; rechts: Verlauf des Peptidrückgrates (violett hervorgehoben)

4.1.4.7 DOSY-Untersuchungen an GnRH-Antagonisten

Untersuchungen zum Diffusionsverhalten der GnRH-Antagonisten werden durch Aufnahme von ^1H -DOSY-Spektren durchgeführt. In reinem DMSO- d_6 zeigen die einzelnen GnRH-Antagonisten keine signifikanten Differenzen untereinander. Trotz der beschriebenen Isomerie von Ozarelix-Acetat liegen alle beobachteten Signale, abgesehen von denen des Acetat-Gegenions und von Lösemittelbestandteilen, auch in diesem Fall auf einer einzigen Linie, was jedoch zumindest ermöglicht, die Präsenz verkürzter Fragmente in den Proben auszuschließen.

Abb. 81 visualisiert die Veränderung des gemessenen Diffusionskoeffizienten von Cetrorelix-Acetat-Proben in Abhängigkeit vom DMSO- d_6 -Gehalt in binären Mischungen aus DMSO- d_6 und D_2O . Der Diffusionskoeffizient bricht beim Übergang von reinem DMSO- d_6 zu einer Mischung mit 70 Vol.-% DMSO- d_6 deutlich ein, was auch mit der Beobachtung einhergeht, dass die hergestellte Lösung deutlich viskoser wird. Allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass sich die ausgebildete Solvathülle in beiden Fällen stark voneinander unterscheidet und daher eine deutliche Veränderung der Diffusionseigenschaften nicht unerwartet auftritt.

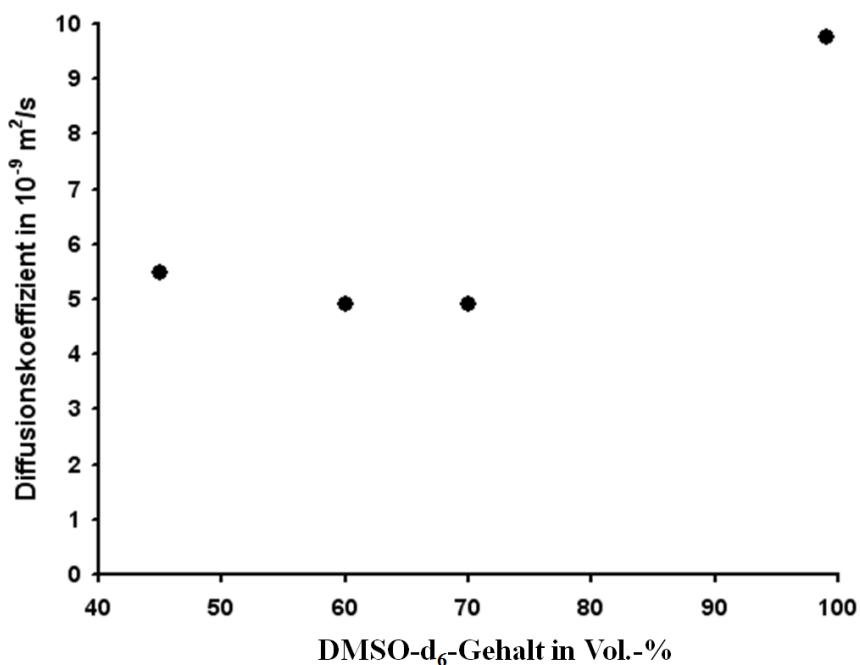


Abb. 81: Veränderung des mittels ^1H -DOSY bestimmten Diffusionskoeffizienten von Cetrorelix-Acetat in Abhängigkeit vom DMSO- d_6 -Gehalt des NMR-Lösungsmittelgemisches

4.2 Die Aggregation eines GHRH-Analogons und Versuche zur Inhibierung dieses Prozesses

4.2.1 Sekundärstrukturanalyse mithilfe der ATR-FTIR-Spektroskopie

4.2.1.1 Sekundärstrukturverteilung in Abhängigkeit vom Aggregationszustand

Die Peptidsequenz und pharmakologische Eigenschaften des im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten synthetischen GHRH-Analogons unterliegen zum gegenwärtigen Zeitpunkt der Geheimhaltung und können daher nicht näher besprochen werden. Die gesamte Sequenz des GHRH-Analogons umfasst jedoch 29 Aminosäure-Reste und besitzt einen stark hydrophoben N-Terminus. Sequenzähnlichkeiten zu den untersuchten GnRH-Antagonisten bestehen nicht. Es handelt sich daher um ein Modellpeptid, anhand dessen eine potentielle Verallgemeinerungsfähigkeit bestimmter, an GnRH-Antagonisten gewonnener Resultate überprüft wird.

Dafür ist es selbstredend erforderlich, zumindest grundlegende Analogien in der Art der Aggregation dieses Peptides zu GnRH-Antagonisten zu sehen, d.h. konkret einen Nachweis für amyloides Verhalten zu führen. Abb. 82 zeigt die ATR-FTIR-Spektren des bei pH 3,0 durch Lyophilisation erhaltenen, deaggregierten Peptides und eines durch Zugabe von Kongorot bei pH 7,0 ausgefällten und daher aggregiert vorliegenden Peptides.

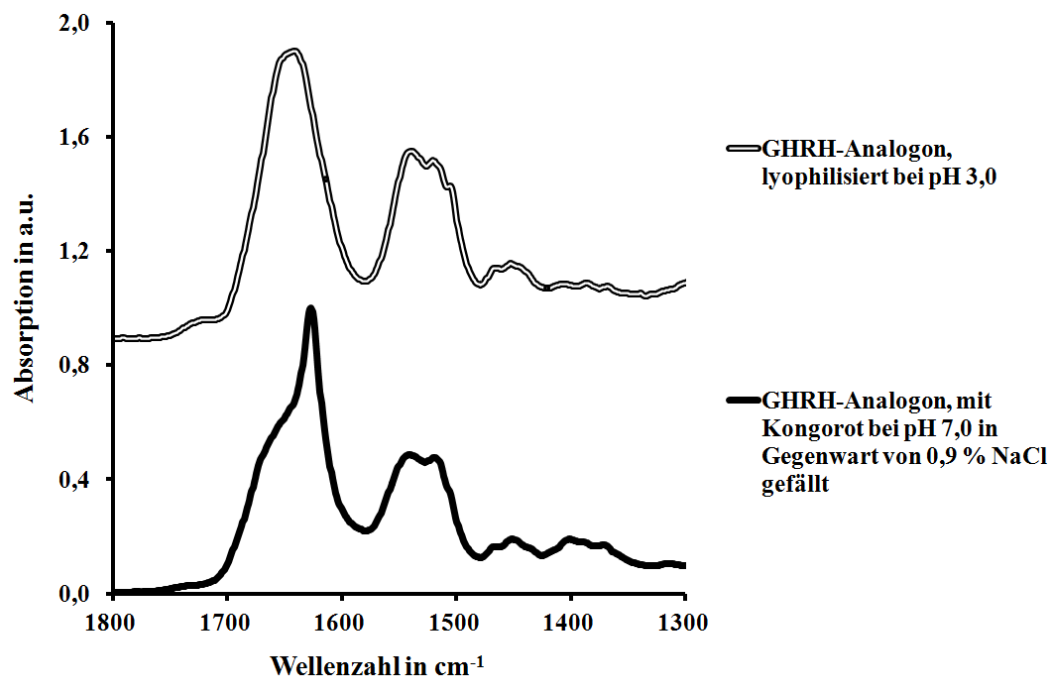


Abb. 82: Vergleich der ATR-FTIR-Spektren des GHRH-Analogons im deaggregierten (oben) und im aggregierten Zustand (unten)

Die charakteristische Veränderung der Amid I-Bande von einer breiten, weitgehend symmetrischen Bande mit einem Maximum bei ca. 1645 cm^{-1} , wie sie für eine Zufallsknäuel-Struktur zu erwarten ist, hin zu einer gemischten Bande mit einer scharfen Teilbande bei ca. 1626 cm^{-1} , wie sie für ein amyloides Aggregat mit erheblichem β -Faltblatt-Anteil auftritt, ist offenkundig. Gleichzeitig ist die Fällbarkeit mit Kongorot ein Nachweis für die Existenz amyloid-typischer Oberflächenstrukturen, die für die Bindung dieser struktur-sensitiven Sonde erforderlich sind.

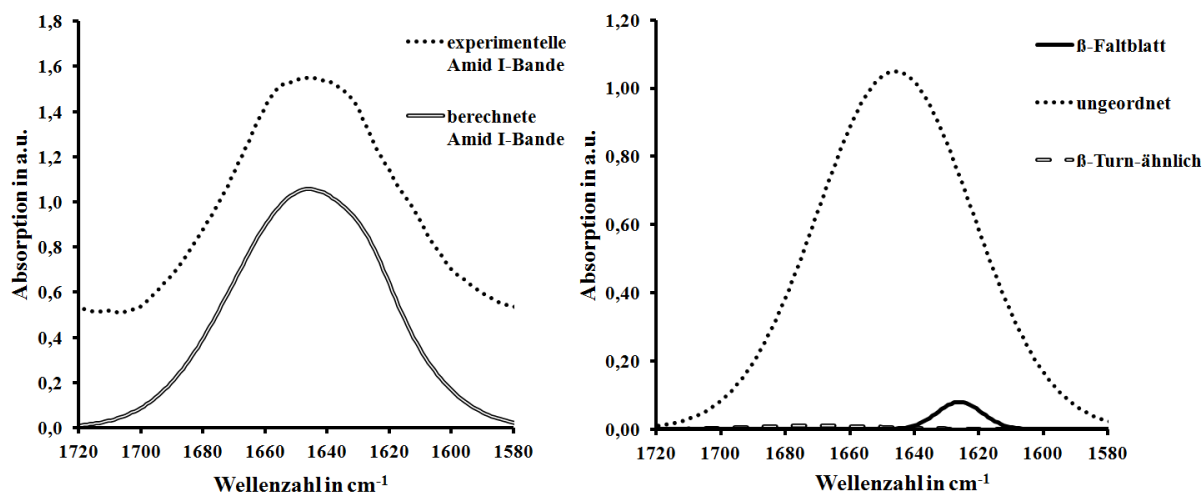


Abb. 83: Bandenformanalyse der Amid I-Bande des deaggregierten GHRH-Analogons (pH 3,0); links: Gegenüberstellung von experimentell bestimmter und berechneter Amid I-Bande; rechts: Darstellung der einzelnen sekundärstrukturspezifischen Gaußfunktionen

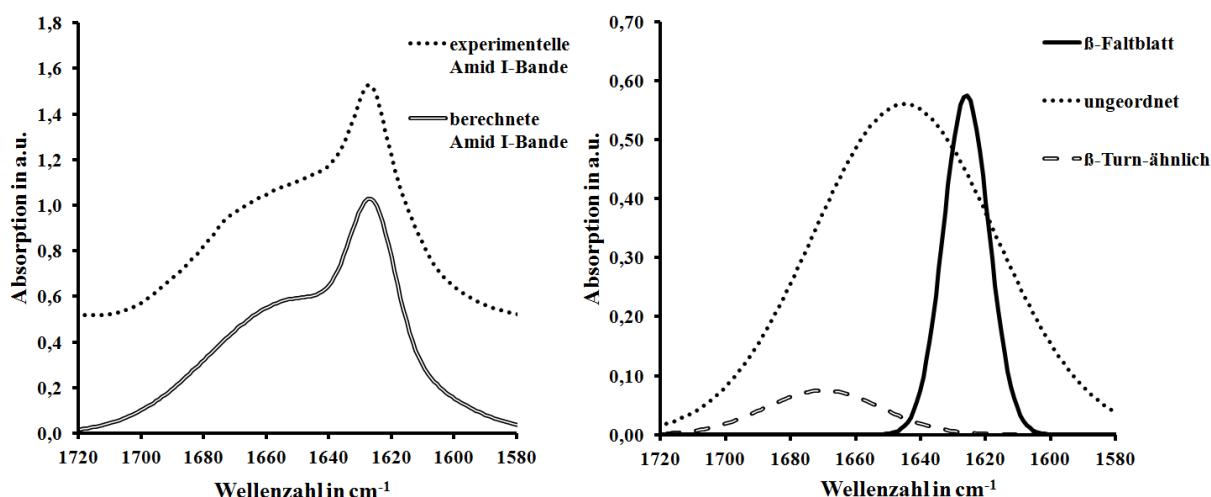


Abb. 84: Bandenformanalyse der Amid I-Bande des aggregierten GHRH-Analogons (pH 9,0); links: Gegenüberstellung von experimentell bestimmter und berechneter Amid I-Bande; rechts: Darstellung der einzelnen sekundärstrukturspezifischen Gaußfunktionen

Eine detaillierte Bandenzerlegung für die Amid I-Bande des deaggregierten Peptides bei pH 3,0 ist in Abb. 83 gegeben. Die schon auf den ersten Blick symmetrische Bande lässt sich annähernd vollständig durch eine Gaußfunktion beschreiben, die dem Verhalten eines Zufallsknäuels entspricht. β -Faltblatt-Anteile sind kaum nachweisbar.

Die Bandenzerlegung für das charakteristische ATR-FTIR-Spektrum eines Aggregates des GHRH-Analogons wird in Abb. 84 anhand eines Fällungsproduktes des Peptides bei pH 9,0 ohne Zuhilfenahme von Kongorot illustriert, um einen möglichen struktur-modifizierenden Einfluss durch die Sonde zu vermeiden. In dieser Abbildung ist die schmale, β -Faltblatt-typische Teilbande bei 1626 cm^{-1} deutlich ausgeprägt. Zusätzlich lassen sich Anteile einer β -Turn-ähnlichen Struktur nachweisen.

Im Gegensatz zu GnRH-Antagonisten wird für das GHRH-Analogon bei sehr niedrigen pH-Werten, wie sie in gewissen Phasen der Peptidsynthese erreicht werden, noch eine weitere Struktur beobachtet, die vom deaggregierten Verhalten bei pH 3,0 signifikant abweicht. Das entsprechende ATR-FTIR-Spektrum und die dazugehörige Bandenzerlegung sind in Abb. 85 veranschaulicht.

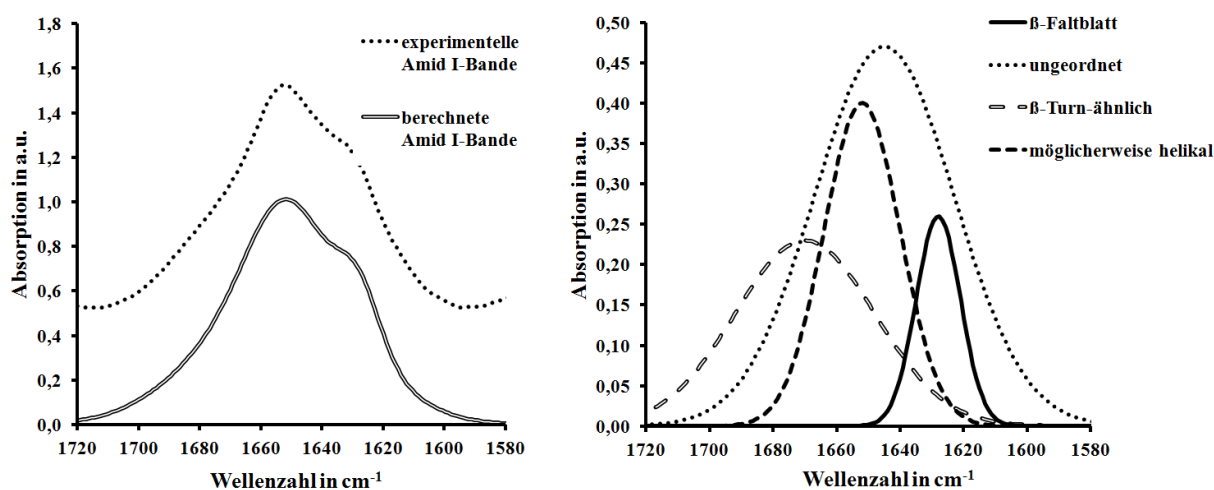


Abb. 85: Bandenformanalyse der Amid I-Bande des GHRH-Analogons direkt aus der Peptidsynthese ($\text{pH} < 2,0$); links: Gegenüberstellung von experimentell bestimmter und berechneter Amid I-Bande; rechts: Darstellung der einzelnen sekundärstrukturspezifischen Gaußfunktionen

In Abb. 85 wird eine stark ausgeprägte, recht scharfe Teilbande bei 1652 cm^{-1} ermittelt. Eine solche Bandenform entspricht dem Verhalten einer α -helikalen Struktur. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass sich aufgrund der analogen Bandenmaxima von Zufallsknäuel und α -Helix diese beiden Strukturmerkmale infrarotspektroskopisch nur sehr

schwierig voneinander unterscheiden lassen. Die geringere Halbwertsbreite spricht in diesem Fall aber für die genannte Zuordnung.

Die quantitative Zusammensetzung bezüglich der einzelnen Sekundärstrukturelemente ist in Abb. 86 für die drei beschriebenen Fälle vergleichend gegenüber gestellt. Der β -Faltblatt-Gehalt beträgt für das untersuchte GHRH-Analogon im aggregierten Zustand bei pH 9 ca. 20 %.

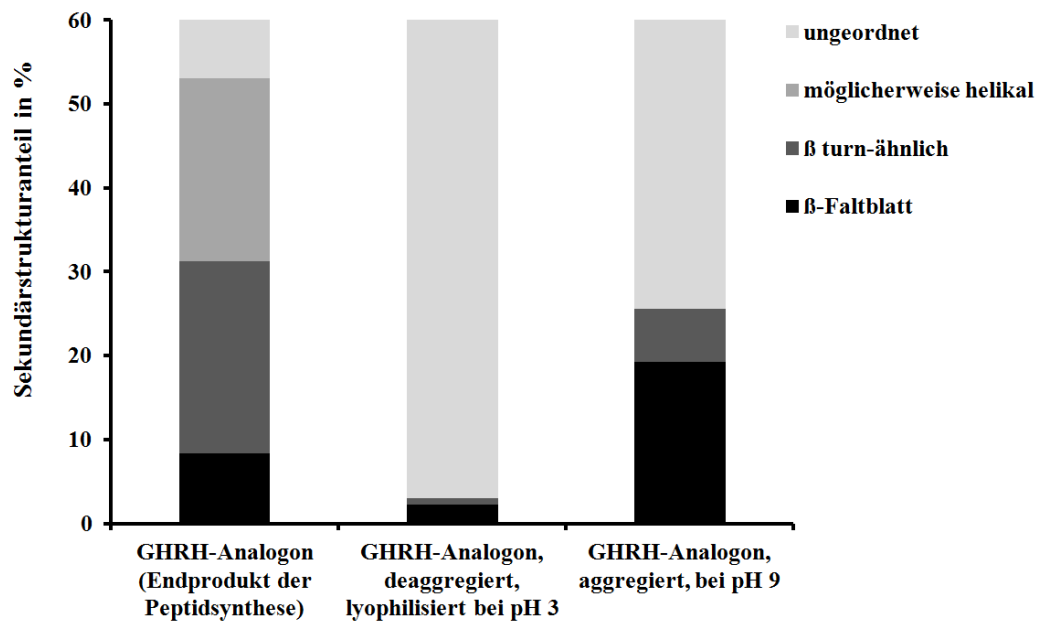


Abb. 86: Gegenüberstellung der quantitativen Zusammensetzung des GHRH-Analogons bezüglich der einzelnen Sekundärstrukturelemente in Abhängigkeit vom Aggregationszustand bei unterschiedlichen pH-Werten

4.2.1.2 Abhängigkeit der Sekundärstrukturverteilung in dem GHRH-Analogon in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und vom pH-Wert

In Analogie zu den pH- und zeitabhängigen Untersuchungen der Sekundärstrukturverteilung von GnRH-Antagonisten aus Abschnitt 4.1.1.3 werden auch für das GHRH-Analogon diese Abhängigkeiten untersucht. In Abb. 87 ist diesbezüglich zunächst die mit bloßem Auge erkennbare Veränderung der Amid I-Bande des Peptides in Abhängigkeit vom pH-Wert nach einstündiger Inkubation abgebildet. Während die Amid I-Bande der Proben bei pH 3 und pH 5 dem breiten Erscheinungsbild des deaggregierten Peptides entspricht, tritt die scharfe Bande der im Zuge der Aggregation ausgebildeten β -Faltblatt-Strukturen in den Proben bei pH 7 und pH 9 zunehmend auf.

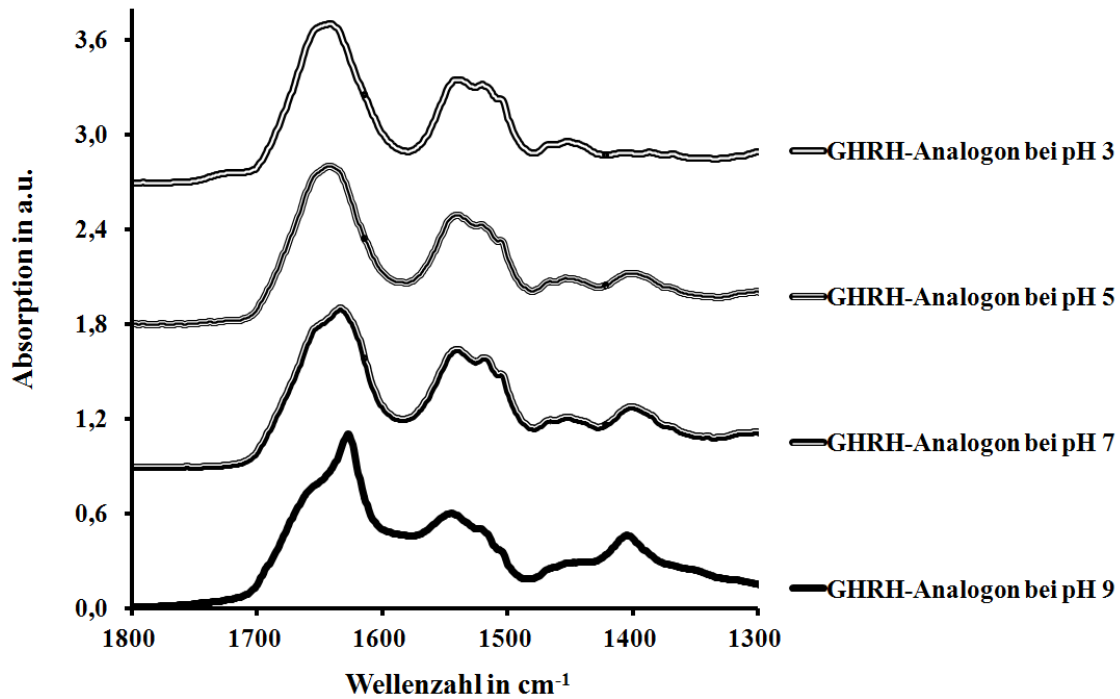


Abb. 87: pH-abhängige Veränderung des ATR-FTIR-Spektrums des GHRH-Analogons im Bereich der Amid-Banden nach einstündiger Inkubation

Die detaillierte Bandenzerlegung bestätigt diese Beobachtung, wie aus Abb. 88 ersichtlich wird. Der β -Faltblatt-Anteil ist erst bei pH 7 erhöht und nimmt bei pH 9 zeitabhängig stark zu.

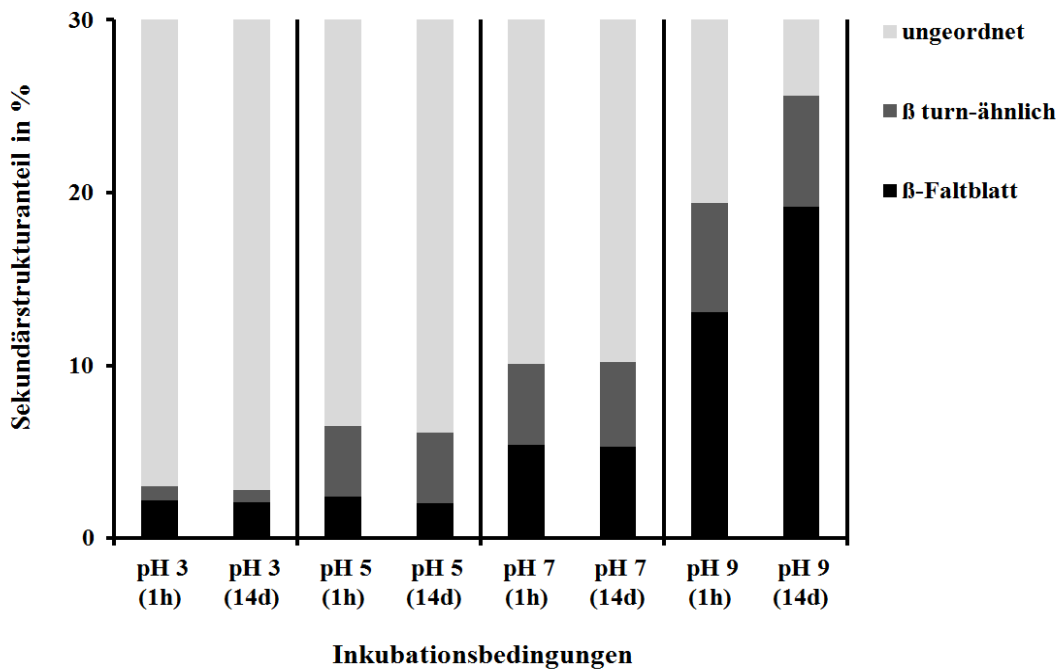


Abb. 88: Sekundärstrukturverteilung von Proben des GHRH-Analogons in Abhängigkeit vom pH-Wert während der Inkubation und von der Inkubationsdauer

4.2.2 Untersuchungen zur Abhängigkeit der Aggregation des GHRH-Analogons von der Peptidkonzentration, dem pH-Wert und dem NaCl-Gehalt

4.2.2.1 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

Die Sequenz des GHRH-Analogons enthält mehrere fluoreszenz-aktive Aminosäure-Reste, was eine Verfolgung der Aggregation des Peptides auf der Basis dieser Eigenschaft als prinzipiell möglich erscheinen lässt. Abb. 89 enthält Anregungs- und Emissionsspektrum des GHRH-Analogons bei einer Peptidkonzentration von 70 µg/ml in Reinstwasser mit 0,1 Vol.-% DMSO. Das spektrale Verhalten wird von einer tyrosintypischen Fluoreszenz dominiert, was auch den Erwartungen entspricht.

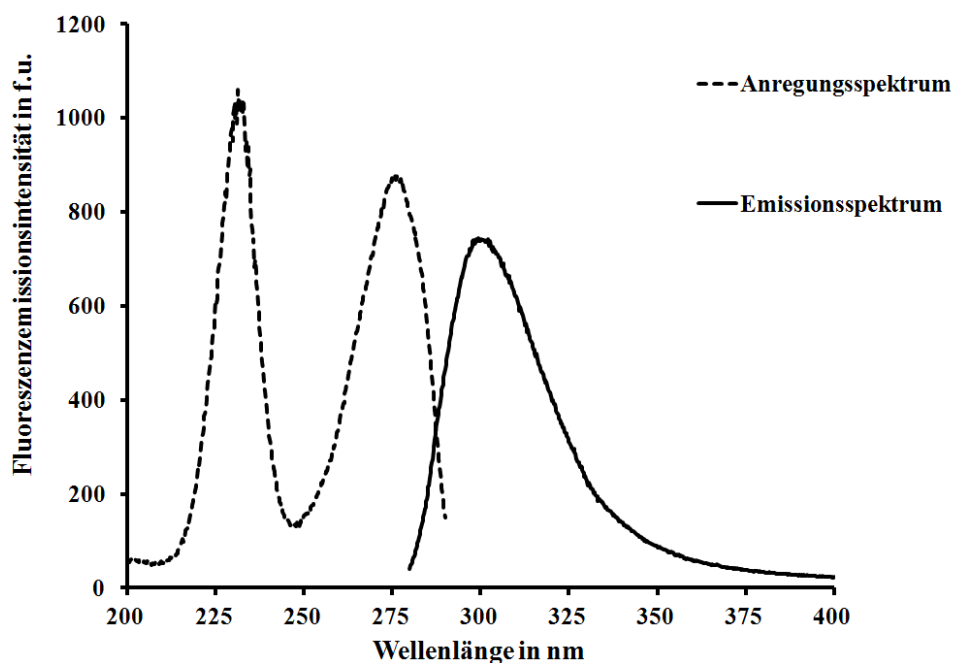


Abb. 89: Anregungs- und Fluoreszenz-Emissionsspektrum des GHRH-Analogons bei einer Peptidkonzentration von 70 µg/ml in Reinstwasser mit 0,1 Vol.-% DMSO

Zwecks Untersuchung des konzentrationsabhängigen Verhaltens der Fluoreszenz des Peptides werden gemäß Abschnitt 3.5 mehrere Verdünnungsreihen mit unterschiedlichen Zusätzen für Messungen herangezogen. Zur Klärung des Einflusses des häufig in Peptidformulierungen verwendeten Propylenglykols werden die in Abb. 90 wiedergegebenen Messreihen untersucht. In Gegenwart von Propylenglykol werden lediglich für Peptidgehalte oberhalb von 0,2 mg/ml leicht abweichende Werte von der propylenglykol-freien Messreihe beobachtet, sodass kein wesentlicher Einfluss nachweisbar ist. Darüber hinaus treten im

4 Ergebnisse

untersuchten Konzentrationsbereich keine Brüche oder Abweichungen vom linearen Zusammenhang zwischen Fluoreszenz-Emission und Peptidkonzentration auf, weshalb eine Bestimmung einer kritischen Aggregatbildungskonzentration (*cac*), wie es für GnRH-Antagonisten möglich ist, in diesem Fall nicht durchgeführt werden kann.

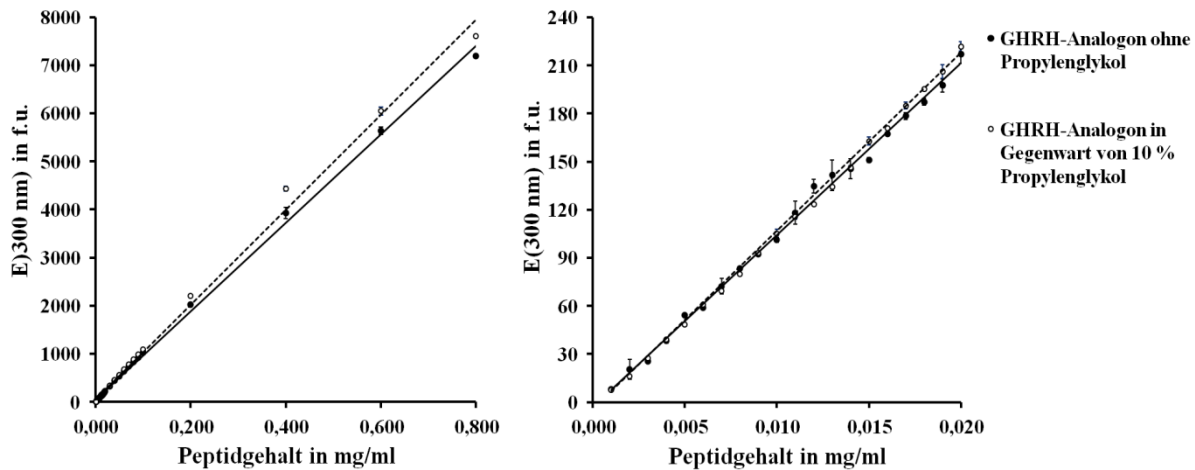


Abb. 90: Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenz-Emission des GHRH-Analogons in Gegenwart bzw. Abwesenheit von 10 Vol.-% Propylenglykol in zwei unterschiedlichen Peptid-Konzentrationsbereichen

Die Veränderung der gemessenen Fluoreszenz in Gegenwart von 0,9 % Natriumchlorid ist im linken Teil von Abb. 91 zu sehen. Offenkundig wird die Emission in der NaCl-haltigen Lösung systematisch erhöht, was auf eine grundsätzliche Änderung der Umgebung der tyrosinartigen Aminosäure-Reste hinweist.

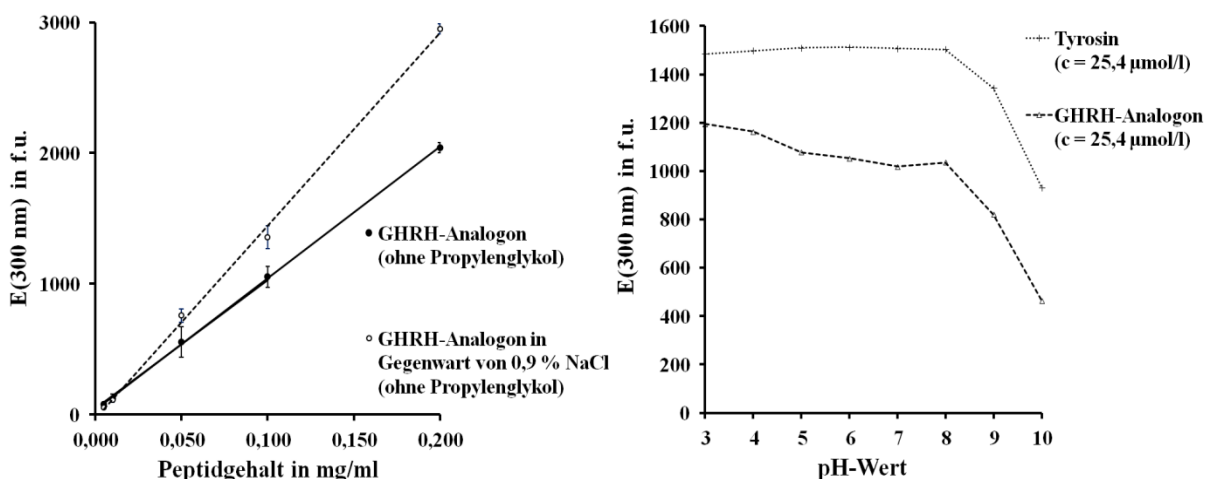


Abb. 91: Abhängigkeit der Fluoreszenz-Emission des GHRH-Analogons vom NaCl-Gehalt (links) und vom pH-Wert im Vergleich zum Verhalten von Tyrosin (rechts; Konzentrationsangaben beziehen sich im Fall des GHRH-Analogons auf die enthaltenen tyrosinartigen Reste)

Ein Bruch im Verhalten bei einer diskreten Peptidkonzentration ist hingegen in Abb. 91 nicht zu verzeichnen, was wiederum nahelegt, für diesen Effekt keine intermolekulare Assoziation, sondern vielmehr eine Konformationsänderung bzw. schlichtweg die veränderte Solvatumgebung durch den NaCl-Gehalt für diese Emissionssteigerung verantwortlich zu machen.

Im rechten Teil der Abbildung ist die pH-Abhängigkeit einer stets gleich konzentrierten GHRH-Analogon-Lösung einer äquivalenten Tyrosin-Lösung gegenübergestellt. Die zwischen pH 3 und pH 8 nur schwach abfallende Emissionsintensität bricht oberhalb von pH 8 schrittweise zusammen. Dieses Verhalten lässt sich allerdings in gleicher Weise in der Tyrosin-Referenz nachvollziehen und steht mit der Tyrosinat-Bildung in Zusammenhang.

Die darüber hinaus durchgeführten zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen (TCSPC) zeigen gleichfalls keine aggregationstypischen Veränderungen, weshalb auf eine explizite Darstellung verzichtet wird.

4.2.2.2 Untersuchungen mit struktur-sensitiven Sonden

Als struktur-sensitive Sonden kommen ANS (für hydrophobe Bereiche), sowie Kongorot und ThioT (beide für amyloide Bereiche) zum Einsatz. Da mittels ANS keine signifikanten Unterschiede in den Konzentrationsreihen des GHRH-Analogons in Gegenwart von Propylenglykol bzw. Natriumchlorid festzustellen sind, wird von einer Darstellung dieser Resultate abgesehen. Die erhaltenen Kurven können jedoch der Anhang-DVD unter "GHRH-Analogon/Sondenbindungsuntersuchungen/Einfluss_von_NaCl_und_Propylenglykol" entnommen werden.

Die Resultate der Messreihen mit Kongorot und ThioT sind in Abb. 92 dargestellt. In beiden Diagrammen ist zu erkennen, dass ein Anteil von 10 Vol.-% Propylenglykol keinen signifikanten Einfluss auf das Verhalten der verwendeten Sonden hat. Der Zusatz von 0,9 % Natriumchlorid zeitigt hingegen deutlich sichtbare Veränderungen. Bei der Untersuchung mit ThioT wird dessen Emissionsintensität in Gegenwart der NaCl-haltigen Peptidproben dramatisch verstärkt, was für eine forcierte Amyloidbildung des Peptides unter diesen Konditionen spricht.

Für Kongorot wird in Gegenwart von NaCl ein Einbruch des aufgetragenen Absorptionsquotienten sichtbar. Da dieser Quotient in Abwesenheit von amyloiden Strukturen seinen Maximalwert erreicht, in Präsenz solcher Strukturen hingegen einem Wert von 0 zustrebt, führt diese Beobachtung zu der analogen Erkenntnis, dass Natriumchlorid die

4 Ergebnisse

Amyloid-Formierung des GHRH-Analogons begünstigt. Die hierbei ausgewertete Veränderung der Gestalt des Absorptionsspektrums von Kongorot in Gegenwart amyloider Strukturen ist anhand der Spektrenfolge in Abb. 93 noch einmal optisch nachzuvollziehen.

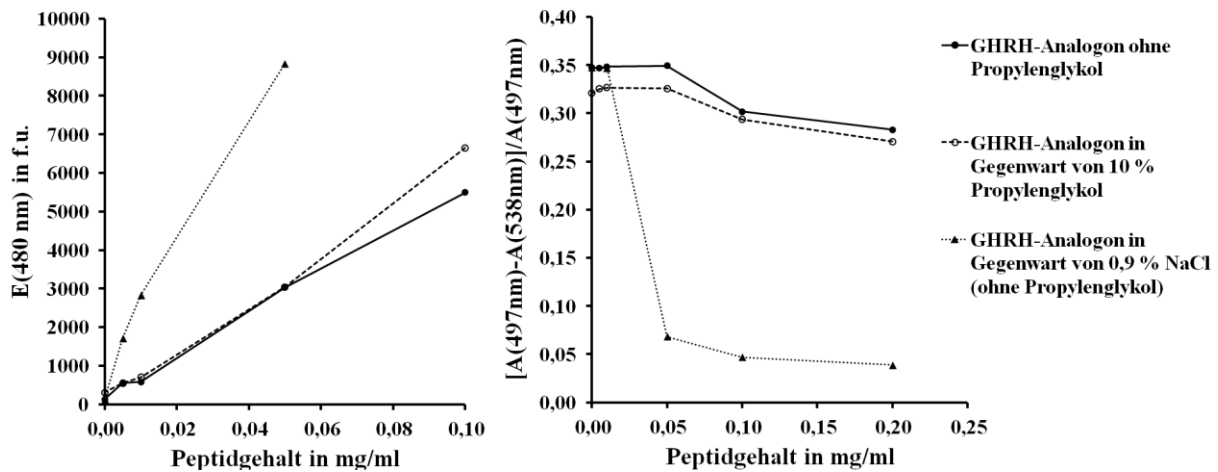


Abb. 92: Fluoreszenz-Emission von ThioT (links) und amyloid-sensitiver Absorptionsquotient von Kongorot (rechts) in Abhängigkeit von der Konzentration des GHRH-Analogons in Gegenwart von Propylenglykol und Natriumchlorid

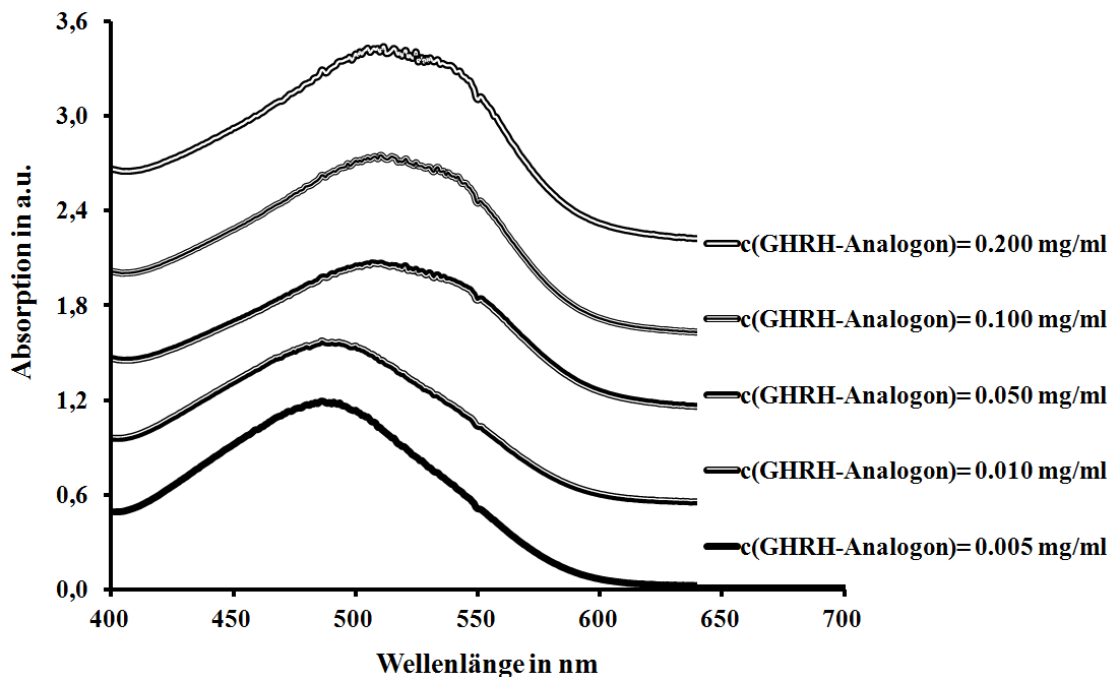


Abb. 93: UV/vis-Spektren von Kongorot in Gegenwart einer Konzentrationsreihe des GHRH-analogons bei einem Natriumchlorid-Gehalt von 0,9 %

4.2.3 Untersuchungen der Wirkung potentieller Inhibitoren der Aggregation des GHRH-Analogons mit struktursensitiven Sonden

4.2.3.1 Der Einfluss von Bernsteinsäure, D/L-Weinsäure und L-Ascorbinsäure

Die in den vorhergehenden Abschnitten dargestellten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass das betrachtete GHRH-Analogon eine amyloide Aggregation zeigt, die jedoch im Vergleich zu GnRH-Antagonisten gewisse Ansatzpunkte bietet, die eine Aggregationsinhibierung leichter möglich erscheinen lassen. Daher werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Zusammenhang mit dem GHRH-Analogon annähernd ausschließlich Substanzen als potentielle Aggregationsinhibitoren getestet, die in den USA gemäß der Paragraphen 201(s) und 409 des *Federal Food, Drug, and Cosmetic Act's* als *GRAS (Generally Recognized As Safe)* eingestuft werden und daher unter deutlich verringerten Testungsauflagen in einer pharmazeutischen Formulierung Verwendung finden können.

Bernsteinsäure, D/L-Weinsäure und L-Ascorbinsäure erfüllen diese Kriterien und weisen überdies verschiedenartige Gruppierungen auf, die potentiell in die Ausbildung von Wasserstoffbrücken-Netzwerken eingreifen können, wie sie für die Ausbildung der amyloid-typischen β -Faltblatt-Strukturen erforderlich sind.

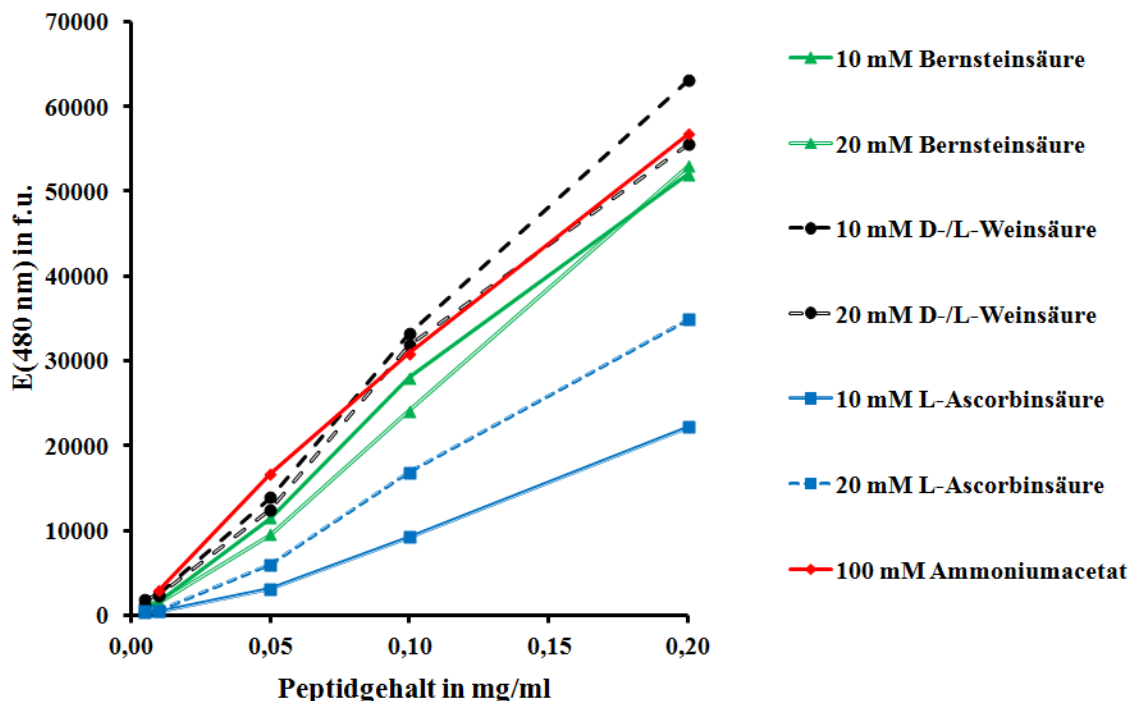


Abb. 94: Charakteristische Emission der Sonde ThioT in Gegenwart von amyloiden β -Faltblatt-Strukturen des GHRH-Analogons in Abhängigkeit von der Präsenz bestimmter Additive nach 3 d Inkubation bei pH 7,0 und einem Natriumchlorid-Gehalt von 0,9 %

Abb. 94 illustriert zunächst das Verhalten der amyloid-sensitiven Sonde ThioT gegenüber Konzentrationsreihen des GHRH-Analogons in Gegenwart der drei getesteten Additive. Die Durchführung der Untersuchungen erfolgt dabei gemäß Abschnitt 3.6, wobei für alle Proben der pH-Wert 1 h bzw. 3 d vor der Messung auf pH 7,0 eingestellt und der Natriumchlorid-Gehalt auf 0,9 % angehoben wird, sodass zum Zeitpunkt des Experimentes alle Lösungen bezüglich dieser Parameter einheitlich vorliegen.

In Abb. 94 dient, wie auch in den folgenden Abbildungen, das Verhalten des GHRH-Analogons in einer 100 mM Ammoniumacetat-Lösung als Referenz. Bei Betrachtung der Abbildung ist erkennbar, dass sich der Kurvenverlauf der Weinsäure-haltigen Proben nicht signifikant vom Verhalten der Referenz unterscheidet, wohingegen die Proben in Gegenwart von Bernsteinsäure systematisch leicht verringerte Emissionen der Sonde ThioT zeigen und in Gegenwart von L-Ascorbinsäure eine bis zu 60 %ige Reduktion der Fluoreszenz-Emission beobachtet wird, was auf eine deutliche Verringerung des Amyloid-Gehaltes letztgenannter Proben hinweist.

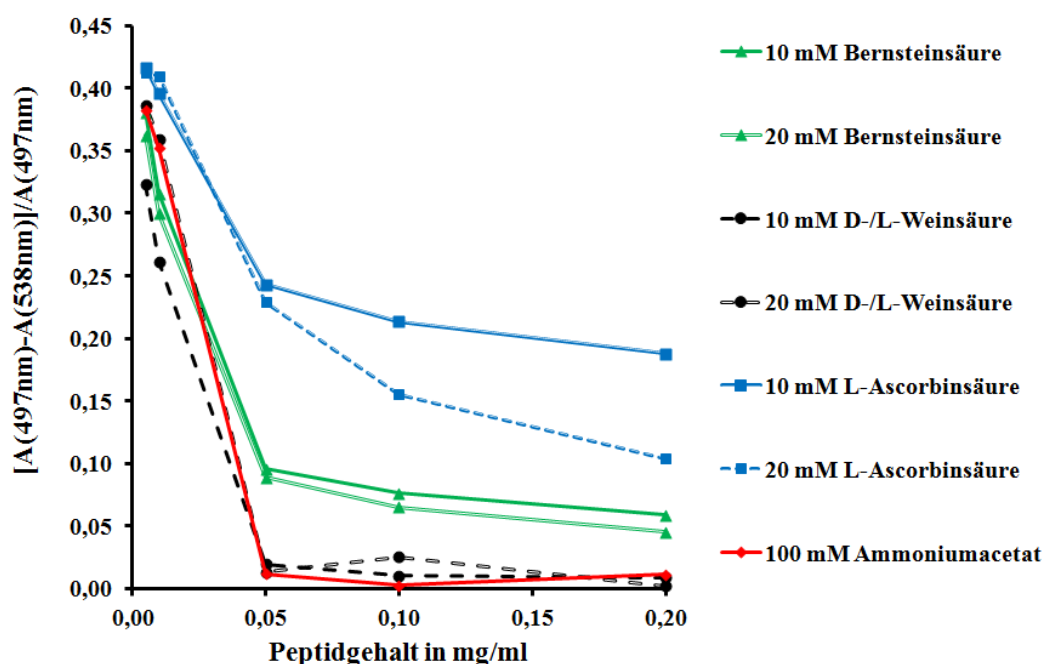


Abb. 95: Charakteristischer Absorptionsquotient der Sonde Kongorot in Gegenwart von amyloiden β -Faltblatt-Strukturen des GHRH-Analogons in Abhängigkeit von der Präsenz bestimmter Additive nach 1 h Inkubation bei pH 7,0 und einem Natriumchlorid-Gehalt von 0,9 %

Unter Nutzung der ebenfalls amyloid-sensitiven Sonde Kongorot werden die in Abb. 95 dargestellten Resultate ermittelt. Die Sonden Kongorot und ThioT binden aufgrund ihrer entgegengesetzten Ladung und unterschiedlichen Größe an verschiedene Oberflächen-

strukturen von amyloiden Aggregaten, was bei Einsatz beider Sonden zu einer erheblichen Steigerung der Interpretationssicherheit der erhaltenen Ergebnisse führt (vgl. Abschnitt 1.3.2). Die Ergebnisse aus Abb. 95 bestätigen in dieser Hinsicht einerseits die Resultate aus Abb. 94 insoweit, dass D/L-Weinsäure keinen messbaren Einfluss auf die Aggregation des GHRH-Analogons hat, Bernsteinsäure zu einer leichten Verringerung des Amyloid-Gehaltes führt und durch L-Ascorbinsäure eine drastische Reduktion dieser Aggregationsform hervorgerufen wird. Darüber hinaus bestätigt sich jedoch auch, dass der Aggregations-inhibierende Effekt in Gegenwart von 10 mM L-Ascorbinsäure stärker ausgeprägt ist, als in Gegenwart der doppelten Konzentration dieses Additivs, was bereits in Abb. 94 zu sehen ist. Für Bernsteinsäure und Weinsäure ist kein signifikanter Einfluss der Additiv-Konzentration zu verzeichnen.

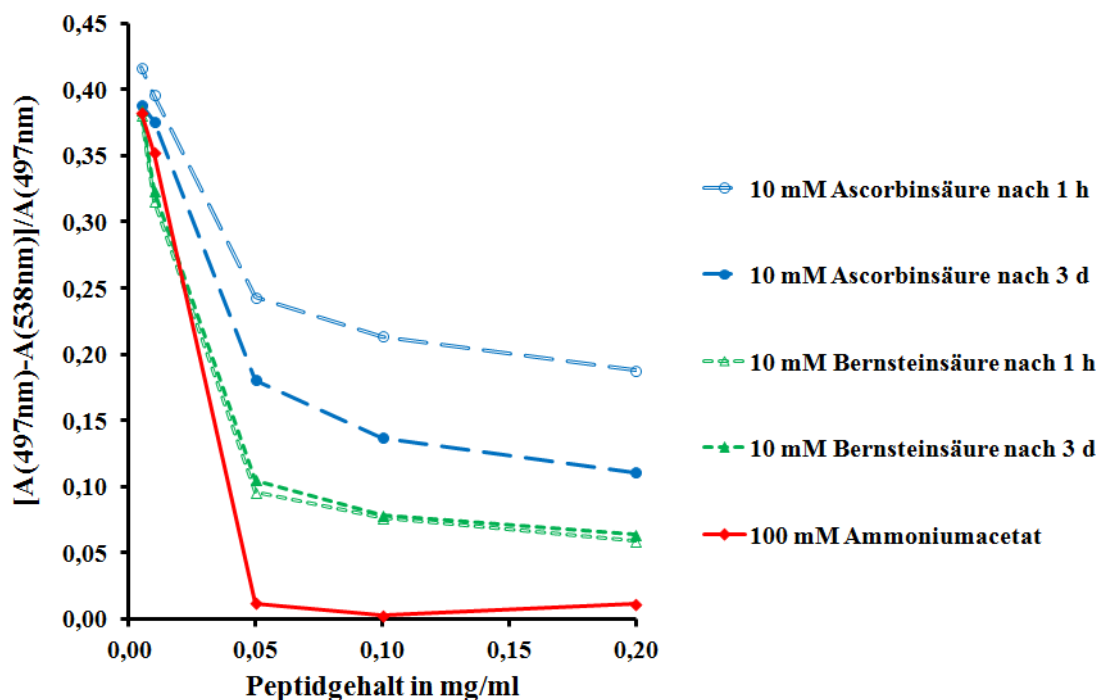


Abb. 96: Charakteristischer Absorptionsquotient von Kongorot in Gegenwart amyloider Strukturen für GHRH-Analogon-Proben, inkubiert für 1 h bzw. 3 d bei pH 7,0 und einem Natriumchlorid-Gehalt von 0,9 % in

Die mittels Kongorot erfassten, zeitabhängigen Unterschiede zwischen den Messpunkten nach 1 h Inkubation und 3 d Inkubation bei pH 7,0 und 0,9 % Natriumchlorid-Gehalt sind in Abb. 96 für die Proben in Präsenz von 10 mM Bernsteinsäure und 10 mM L-Ascorbinsäure vergleichend gegenüber gestellt. Während für Bernsteinsäure keine Zeitabhängigkeit des

Kurvenverlaufs erkennbar ist, fällt für L-Ascorbinsäure deutlich ins Auge, dass der nach 1 h beobachtbare, aggregationsinhibierende Effekt nach 3 d merklich verringert auftritt.

Neben dem Aufbau von β -Faltblatt-Strukturen legt die Sequenz des Peptides auch die Möglichkeit nahe, dass im Verlauf der Aggregation hydrophobe Assoziationen auftreten könnten. Dieser Effekt lässt sich mithilfe der Sonde ANS detaillierter erfassen. Abb. 97 zeigt die charakteristische Emission der genannten Sonde bei Einlagerung in hydrophobe Cluster für Konzentrationsreihen des GHRH-Analogons in Gegenwart der untersuchten Additive. Dabei ist offenkundig, dass Bernsteinsäure keinen reduzierenden Effekt zeigt, während die detektierten hydrophoben Bereiche in Präsenz von D/L-Weinsäure und L-Ascorbinsäure etwas verringert werden, wodurch eine Korrelation zur Polarität des Additivs vermutet werden kann.

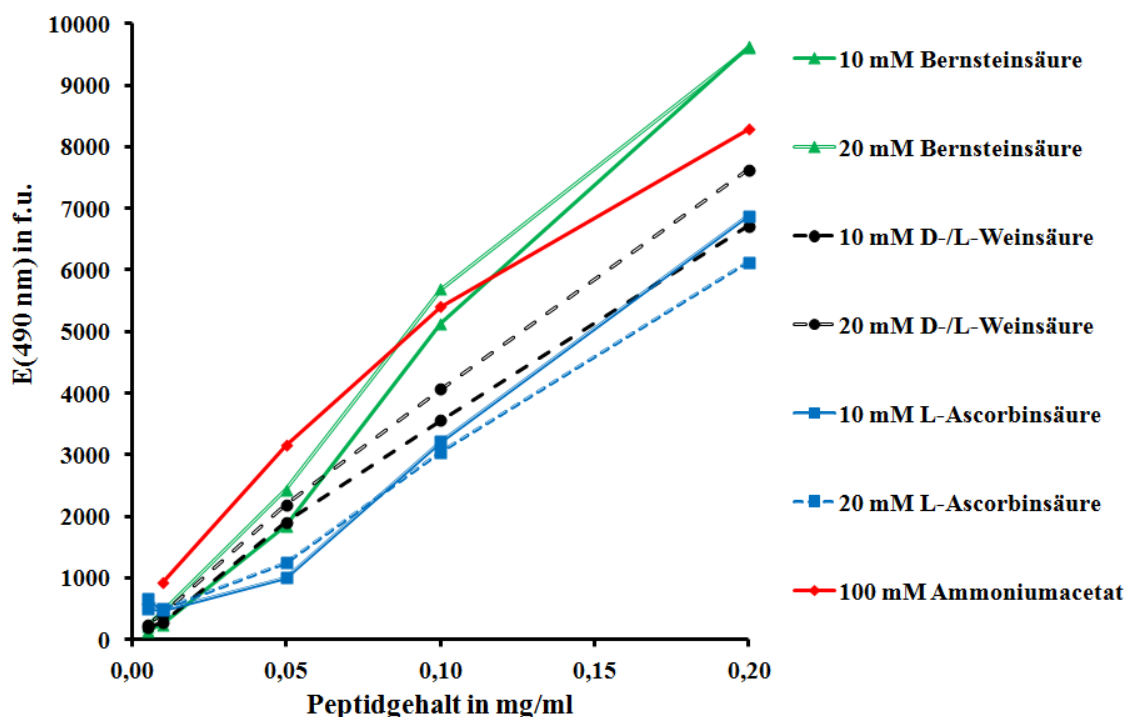


Abb. 97: Charakteristische Emission der Sonde ANS in Gegenwart von hydrophoben Clustern des GHRH-Analogons in Abhängigkeit von der Präsenz bestimmter Additive nach 3 d Inkubation bei pH 7,0 und einem Natriumchlorid-Gehalt von 0,9 %

4.2.3.2 Der Einfluss von Zitronensäure und Embonsäure/Benzylalkohol-Systemen

Anhand von Zitronensäure soll der Einfluss einer Tricarbonsäure und anhand von Embonsäure der Einfluss einer Dicarbonsäure mit einem sterisch anspruchsvollen, unpolaren System auf die Aggregation des GHRH-Analogons untersucht werden. Weil Embonsäure

nicht ohne weiteres in wässrigen Systemen löslich ist, wird als Löslichkeitsvermittler Benzylalkohol zugesetzt, weshalb in einer gesonderten Messreihe die Beeinflussung des Peptides durch letztgenannte Komponente separat analysiert wird.

Die Ergebnisse der Untersuchungen mithilfe der Sonden ThioT und ANS sind in Abb. 98 abgebildet. Im linken Bereich der Abbildung ist zu erkennen, dass die durch ThioT detektierten amyloiden Bereiche in Gegenwart von Zitronensäure nicht signifikant von der Referenz abweichen, wohingegen bereits durch Zugabe von 1 % Benzylalkohol eine leichte Verringerung und in Gegenwart des Mischsystems aus Embonsäure und Benzylalkohol sogar eine sehr starke Reduktion dieser Strukturen beobachtet wird.

Die im rechten Bereich der Abbildung aufgeführten Emissions-Kurven der Sonde ANS zeigen darüber hinaus, dass im genannten Mischsystem drastisch erhöhte Anteile hydrophober Umgebungen erkannt werden, wohingegen Zitronensäure und Benzylalkohol selbst kaum eine Veränderung bewirken.

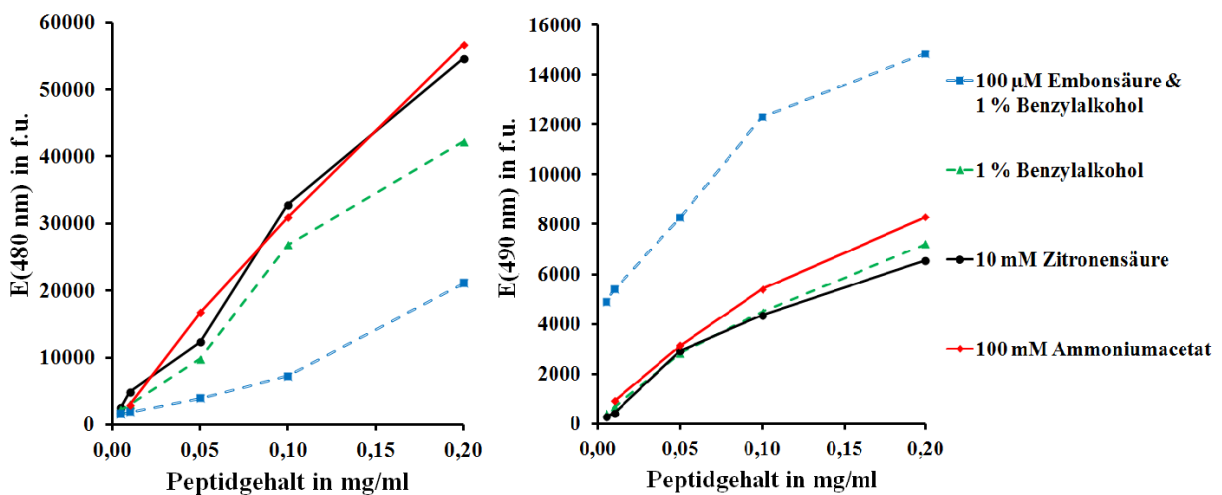


Abb. 98: Fluoreszenzemission der Sonde ThioT (links) bzw. ANS (rechts) für Konzentrationsreihen des GHRH-Analogons in Gegenwart von 10 mM Zitronensäure, 1 % Benzylalkohol und einer Mischung aus 100 µM Embonsäure und 1 % Benzylalkohol nach 3 d Inkubation

Das Emissionsverhalten von ANS in Gegenwart des Mischsystems aus Embonsäure und Benzylalkohol muss jedoch insgesamt als Sonderfall betrachtet werden, was bereits daran deutlich wird, dass die entsprechende Kurve weit davon entfernt ist, durch den Koordinatenursprung der gewählten Auftragung zu verlaufen. Daraus ist zu schlussfolgern, dass bereits das peptidfreie Solvenssystem die Emission der Sonde beeinflusst. Dieser Effekt wird auch bei einem Vergleich der entsprechenden Fluoreszenzemissionspektren in Abb. 99 deutlich. Während die Sonde ANS in allen anderen GHRH-Lösungen, unabhängig vom

verwendeten Additiv, ein Emissionsmaximum bei 465 nm aufweist, ist dieses Spektrum in Gegenwart des Mischsystems einerseits massiv zu höheren Wellenlängen (Maximum bei 520 nm) verschoben und andererseits die Emissionsintensität deutlich verstärkt. Aufgrund des Charakters der wässrigen Mischung von Benzylalkohol und Embonsäure ist eine Mizellbildung durchaus zu erwarten und eine Einlagerung der Sonde ANS in die gebildeten Mizellen trivial verständlich. Die evidente Abhängigkeit der Emissionsintensität der Sonde von der Konzentration des GHRH-Analogons, wie sie aus Abb. 98 eindeutig hervorgeht, spricht jedoch dafür, dass die Mizellen mit dem Peptid interagieren und dabei Strukturen gebildet werden, die eine intensivere Einlagerung der Sonde ermöglichen.

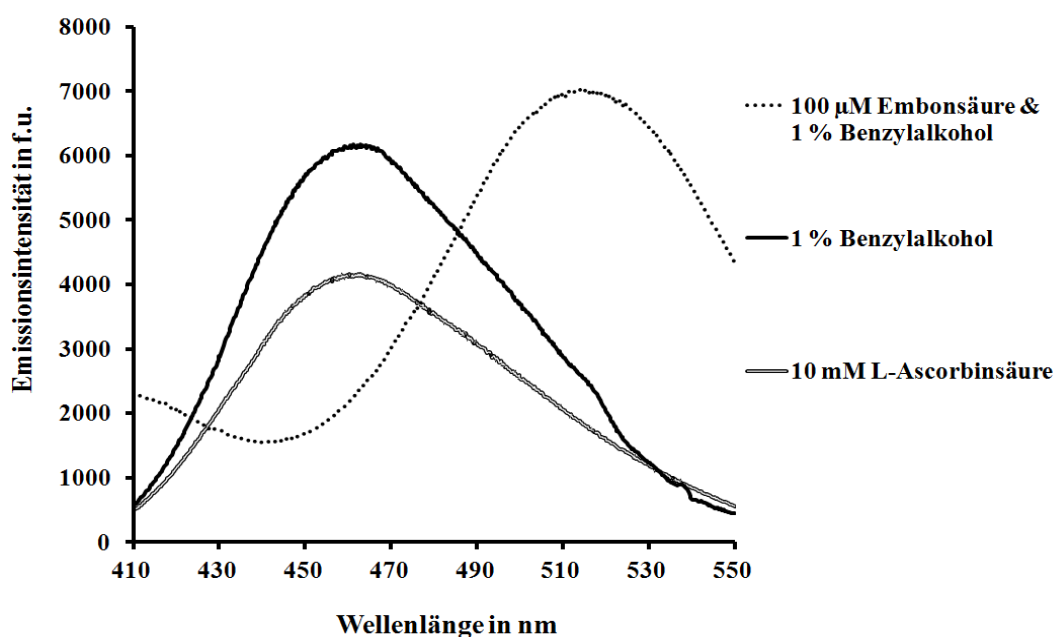


Abb. 99: Fluoreszenz-Emissionsspektren der Sonde ANS in GHRH-Analogon-Proben in Gegenwart von L-Ascorbinsäure, Benzylalkohol bzw. einer Mischung aus Benzylalkohol und Embonsäure bei Peptidgehalten von 0,1 mg/ml in den erstgenannten zwei Fällen bzw. bei 0,01 mg/ml für das Mischsystem

Die Ergebnisse der Untersuchungen mithilfe der Sonde Kongorot sind in Abb. 100 zu sehen. In diesem Fall bestätigt sich zwar, dass Zitronensäure kaum einen Einfluss auf die Aggregation ausübt und das Mischsystem den stärksten Effekt zeigt, jedoch erscheinen die Effekte grundsätzlich schwächer, als sie mit ThioT erfasst werden.

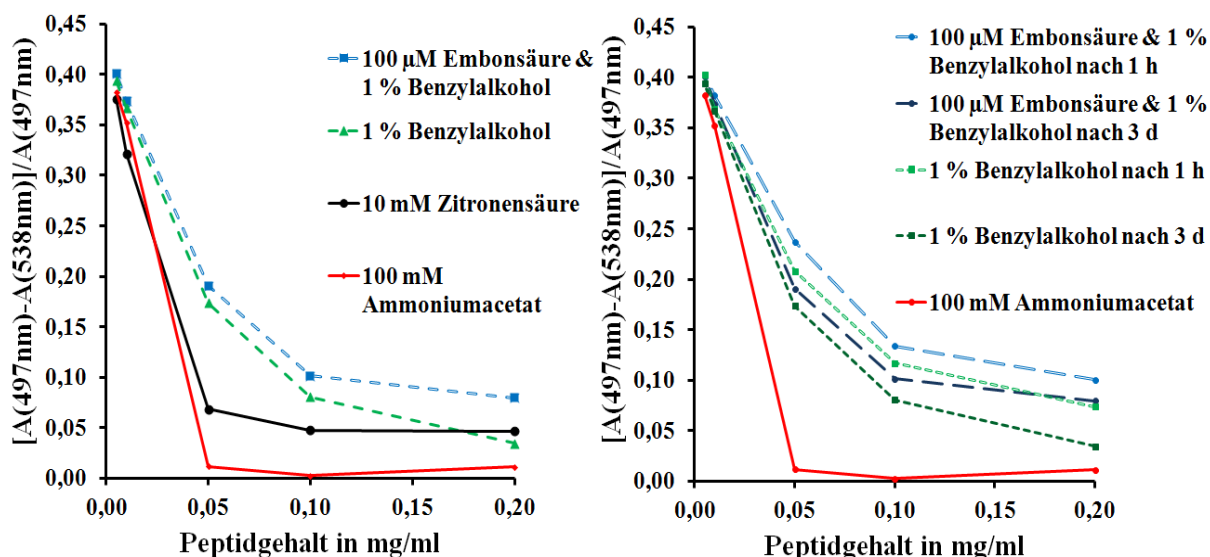


Abb. 100: Charakteristischer Absorptionsquotient der Sonde Kongorot für Konzentrationsreihen des GHRH-Analogons in Gegenwart von 10 mM Zitronensäure, 1 % Benzylalkohol und einer Mischung aus 100 µM Embonsäure und 1 % Benzylalkohol nach 3 d Inkubation; links: Verhalten nach 3 d Inkubation; rechts: Zeitabhängigkeit zwischen 1 h und 3 d

4.2.3.3 Der Einfluss von Gluconsäure

Gluconsäure dient exemplarisch als Modellverbindung für die Interaktion eines anionischen Monosaccharides mit dem GHRH-Analogon. Die zeitabhängigen Fluoreszenz-Emissionskurven der Sonden ThioT und ANS sind in Abb. 101 dargestellt.

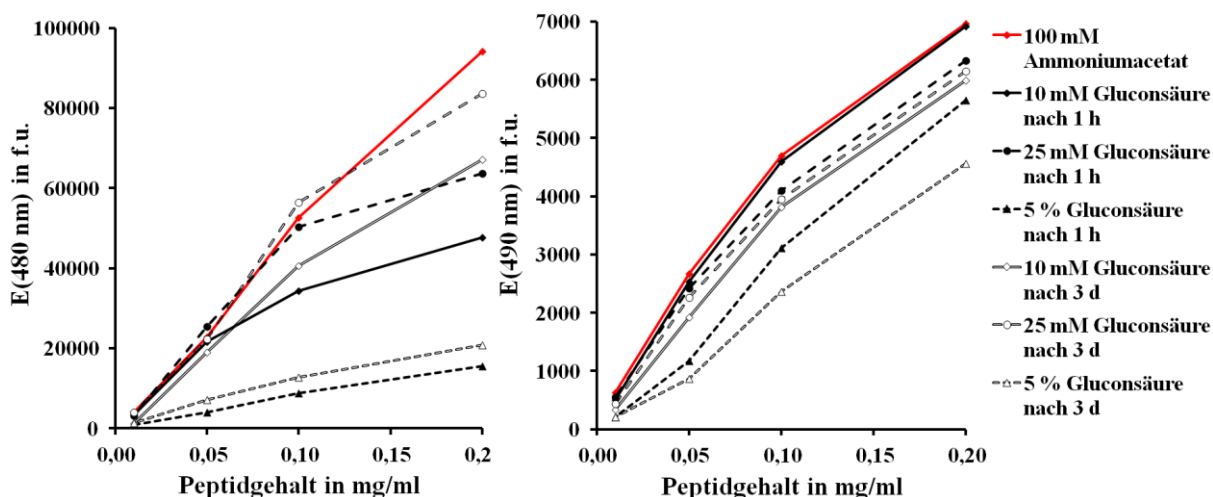


Abb. 101: Fluoreszenzemission der Sonde ThioT (links) bzw. ANS (rechts) für Konzentrationsreihen des GHRH-Analogons in Gegenwart unterschiedlich konzentrierter Gluconsäure-Lösungen nach 1 h bzw. 3 d Inkubation bei pH 7,0 und einem Natriumchlorid-Gehalt von 0,9 %

Es ist ersichtlich, dass insbesondere die 5 %ige Gluconsäure-Lösung eine erhebliche Verringerung der amyloid-spezifischen ThioT-Emission bewirkt. Diese Reduktion geht in den Proben mit lediglich 10 mM bzw. 20 mM Gluconsäure rasch verloren, sodass der Effekt nach 3 d in deutlich verringertem Ausmaß beobachtet wird. In Gegenwart von 5 % Gluconsäure ist zwar auch nach 1 h noch ein signifikant stärkerer Effekt als nach 3 d zu erkennen, gleichsam ist der Effektverlust in diesem Fall merklich geringer.

Mittels ANS wird gleichfalls eine Reduktion der hydrophoben Bereiche detektiert, wobei erneut die Zugabe von 5 % Gluconsäure den größten Effekt zeitigt. Die Zeitabhängigkeit ist in diesem Fall nicht besonders stark ausgeprägt. Es wird dabei systematisch ein leichter Rückgang der hydrophoben Anteile binnen 3 Tagen bemerkt, was auf eine Umstrukturierung des Aggregates hindeutet.

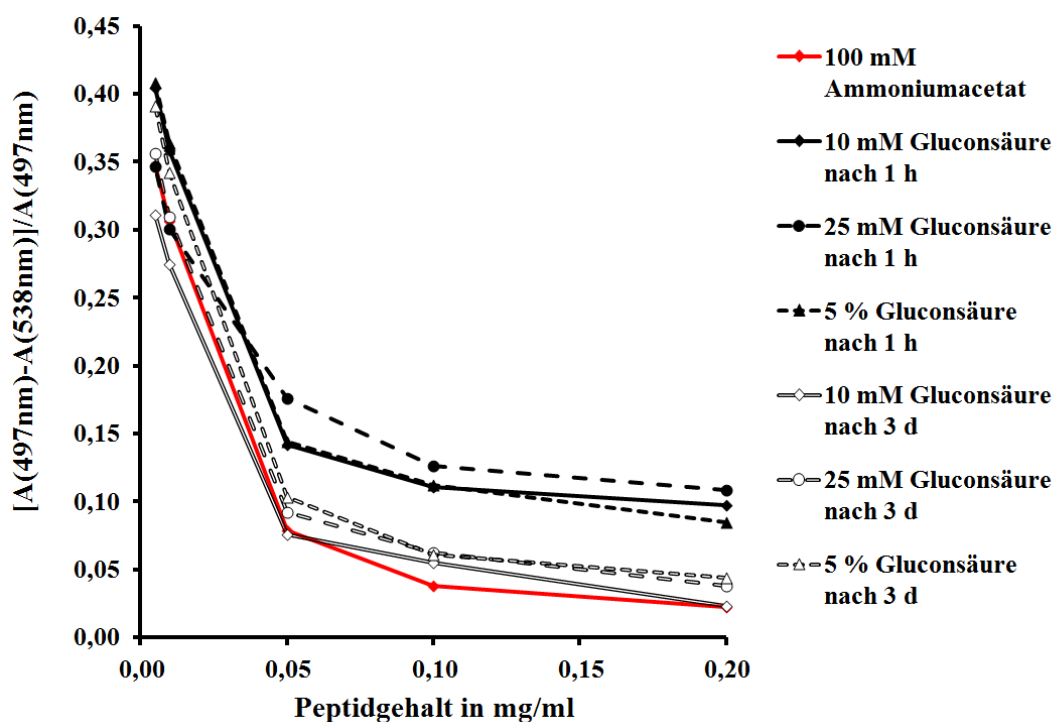


Abb. 102: Zeitabhängiges Verhalten des charakteristischen Absorptionsquotienten von Kongorot in Gegenwart amyloider Strukturen in Konzentrationsreihen des GHRH-Analogons in Anwesenheit verschieden konzentrierter Gluconsäure-Lösungen

Bei entsprechenden Untersuchungen mithilfe der Sonde Kongorot werden die in Abb. 102 abgebildeten Kurven erhalten. Der transiente Effekt der Gluconsäure wird zwar bestätigt, jedoch wird auf diese Weise kein Vorteil durch die Verwendung einer größeren Menge des Additivs verzeichnet.

4.2.3.4 Vergleichende Untersuchungen zum Einfluss der Salzform des GHRH-Analogons (Acetat, Trifluoracetat, Hydrochlorid)

Zwecks Untersuchung des Einflusses der konkreten Salzform des Ausgangsmaterials werden vergleichende Messreihen für das Acetat, das Trifluoracetat und das Hydrochlorid des GHRH-Analogons durchgeführt. Im Folgenden sind jeweils die Ergebnisse der Untersuchungen mit den Sonden ThioT und ANS in Gegenwart der Additive Mannit, DMSO/Propylenglykol und Mannit/Bernsteinsäure nach 1 h Inkubationszeit dargestellt.

Abb. 103 zeigt die erhaltenen Kurven für das Acetat des Peptides. Als Referenz-Lösung dient neben der bekannten 100 mM Ammoniumacetat-Lösung zusätzlich eine 100 mM Ammoniumchlorid-Lösung des Peptides.

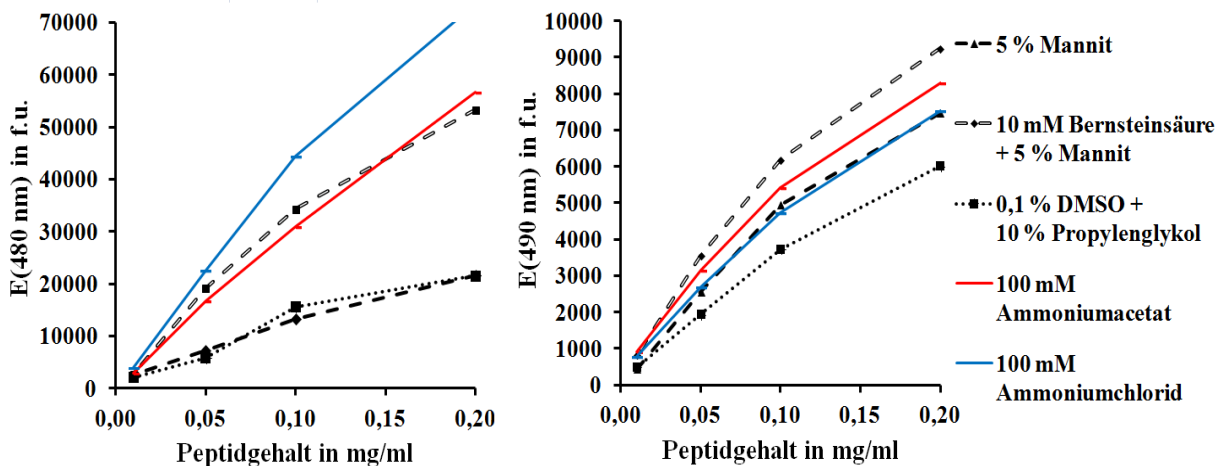


Abb. 103: Acetat-Effekt: Fluoreszenzemission der Sonde ThioT (links) bzw. ANS (rechts) für Konzentrationsreihen des GHRH-Analogons in Gegenwart der im Text genannten Additive nach 1 h Inkubation bei pH 7,0 und einem Natriumchlorid-Gehalt von 0,9 %

In Hinblick auf den Einfluss der verschiedenen Additive ist festzustellen, dass 5 % Mannit und auch die Mischung aus 0,1 % DMSO und 10 % Propylenglykol die amyloid-spezifische ThioT-Emission deutlich reduzieren, wohingegen ein 10 mM Bernsteinsäure-Zusatz die positive Wirkung des Mannits wieder aufzuheben scheint. Die Ammoniumchlorid-haltige Referenz zeigt darüber hinaus eine gegenüber der entsprechenden Ammoniumacetat-Referenz verstärkte Amyloidbildung. Auf die Fluoreszenz-Emission von ANS hat keine der im Rahmen dieser Untersuchungen getesteten Substanzen einen signifikanten Einfluss.

Die analogen Messreihen für das Trifluoracetat und das Hydrochlorid des Peptides sind in Abb. 104 und Abb. 105 zusammengestellt. Es ergeben sich dabei grundsätzlich annähernd

4 Ergebnisse

deckungsgleiche Kurvenverläufe zwischen den verschiedenen Salzen. Daher sind keine grundsätzlichen Effekte auf diesbezügliche Unterschiede der Ausgangsstoffe zurückzuführen. Neben der vorhandenen Ammoniumacetat-Referenz in Abb. 104 war ursprünglich eine weitere Referenz mit Ammoniumtrifluoracetat angedacht. Aufgrund einer weitgehenden Unlöslichkeit des Peptides in diesem Solvens konnte die entsprechende Messreihe allerdings nicht untersucht werden.

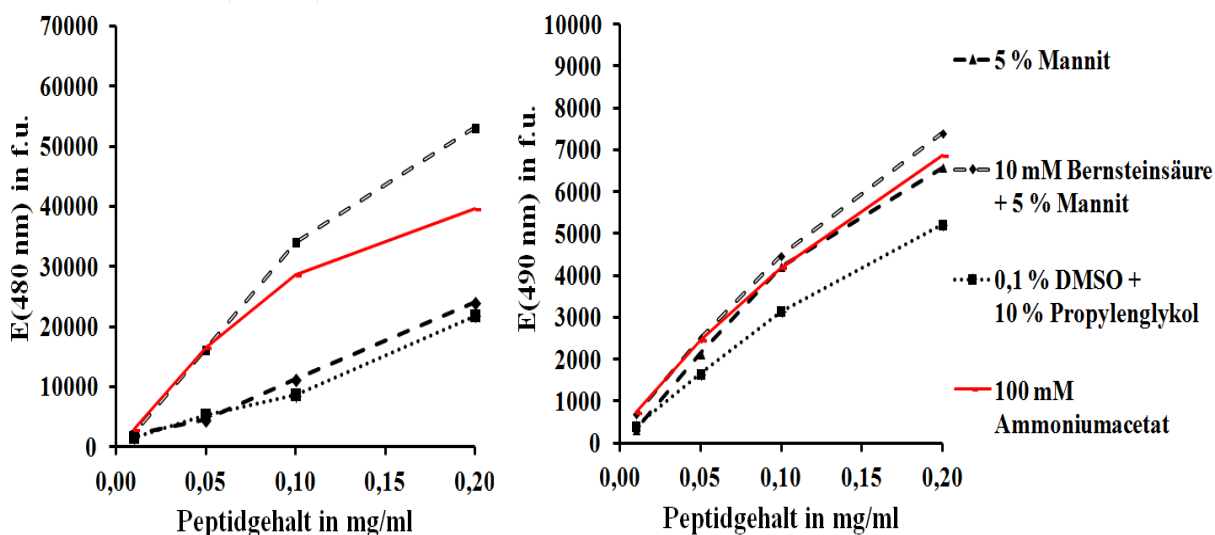


Abb. 104: Trifluoracetat-Effekt: Fluoreszenzemission der Sonde ThioT (links) bzw. ANS (rechts) für Konzentrationsreihen des GHRH-Analogons in Gegenwart der im Text genannten Additive nach 1 h Inkubation bei pH 7,0 und einem Natriumchlorid-Gehalt von 0,9 %

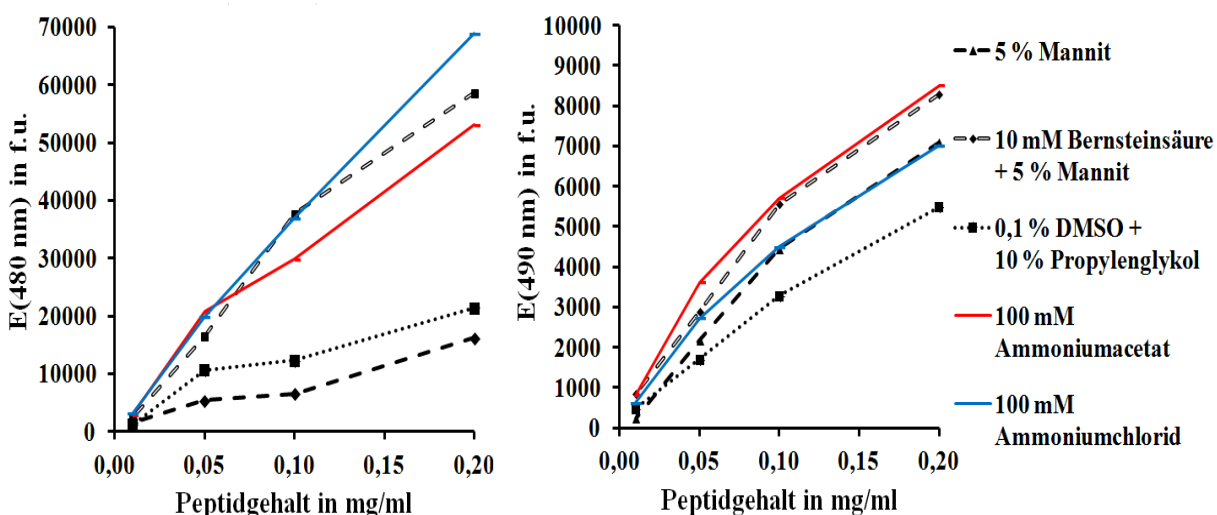


Abb. 105: Hydrochlorid-Effekt: Fluoreszenzemission der Sonde ThioT (links) bzw. ANS (rechts) für Konzentrationsreihen des GHRH-Analogons in Gegenwart der im Text genannten Additive nach 1 h Inkubation bei pH 7,0 und einem Natriumchlorid-Gehalt von 0,9 %

4.2.4 TEM- und Kryo-TEM-Untersuchungen

4.2.4.1 Untersuchungen zur Aggregatgestalt

TEM-Untersuchungen zur Gestalt der Peptidaggregate des GHRH-Analogons erfolgen anhand von Proben, in welchen die Aggregation durch Neutralisation einer zunächst salzsauren Lösung des Peptides mithilfe verdünnter Ammoniaklösung und durch gleichzeitige Anhebung des Natriumchlorid-Gehaltes auf 0,9 % ausgelöst wird. Abb. 106 zeigt zwei unterschiedlich stark vergrößerte Aufnahmen solcher Proben auf einem Kupferträger mit Kohlenstoffbeschichtung, wobei die Kohlenstoffschicht makroskopisch perforiert ist, um die Lösungsmittelverdunstung zu erleichtern. Die genannte Perforation ist im linken Bereich der Abbildung deutlich zu erkennen. Das vorhandene Loch ist mit einem Netzwerk des GHRH-Analogons bedeckt. Die einzelnen fibrillären Aggregatstrukturen sind klar zu erkennen.

Im rechten Bereich der Abbildung ist der zentrale Ausschnitt der Aufnahme noch einmal vergrößert dargestellt. Die teilweise mehrere 100 nm langen Fibrillen weisen recht einheitliche Durchmesser von ca. 13 - 17 nm auf, was mithilfe der software-inhärenten Längenmessung visualisiert ist.

Die gefundene fibrilläre Gestalt bestätigt den bereits vermuteten amyloiden Charakter der entstehenden Aggregate.

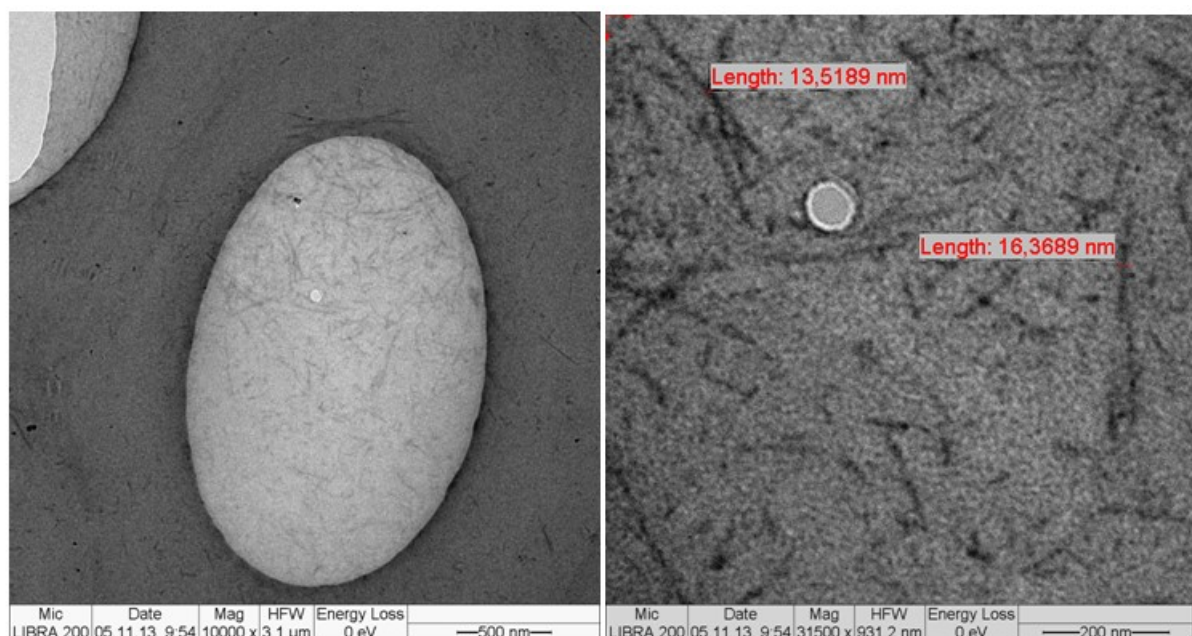


Abb. 106: TEM-Aufnahmen einer GHRH-Analogon-Probe nach Neutralisierung und Anhebung des Natriumchlorid-Gehaltes auf 0,9 % (Probe gemäß Abschnitt 3.9.1 vor der Messung 1:25 (v:v) verdünnt; Maßstab jeweils der Graphik zu entnehmen); "Length" entspricht jeweilig bestimmter Fibrillendicke

4.2.4.2 Untersuchungen zum Einfluss potentieller Aggregationsinhibitoren

In Abschnitt 4.2.3 erweisen sich insbesondere L-Ascorbinsäure und eine Mischung aus 100 μ M Embonsäure und 1 % Benzylalkohol als potentiell effektive Inhibitoren der Aggregation des GHRH-Analogons. Daher werden TEM- und Kryo-TEM-Untersuchungen zur Aggregatgestalt in Gegenwart dieser beiden Additive vorgenommen.

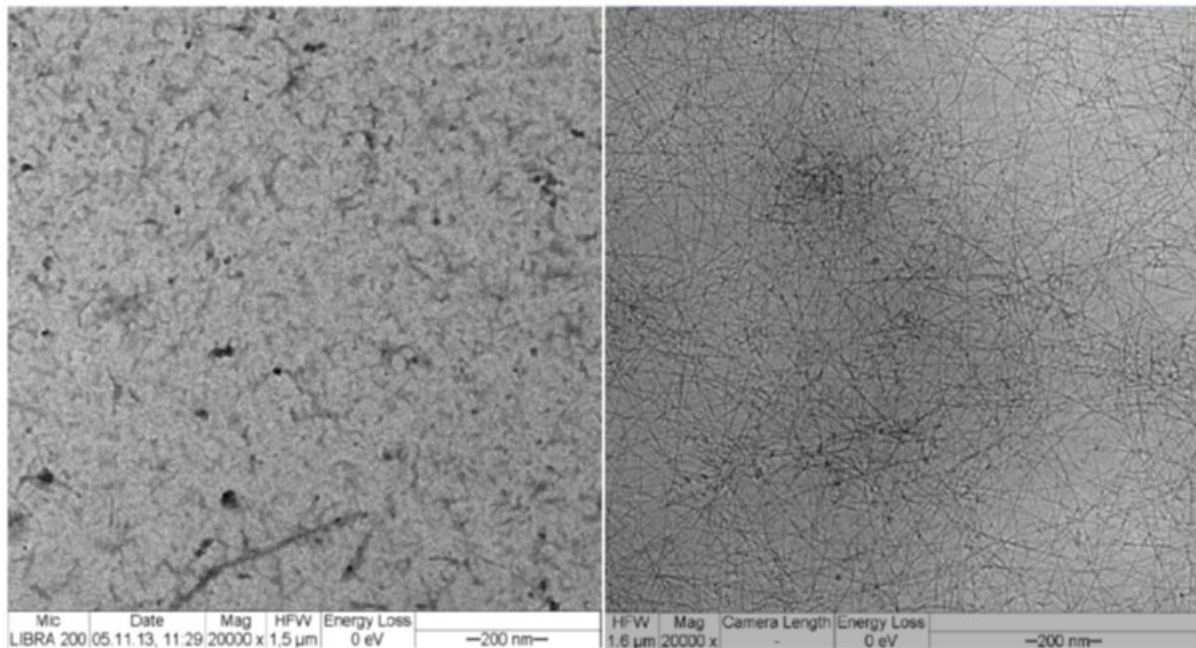


Abb. 107: TEM-Aufnahmen des GHRH-Analogons in Gegenwart von 25 mM L-Ascorbinsäure; links: nach 2 h Inkubation bei pH 7,0 und 0,9 % Natriumchlorid-Gehalt (TEM); rechts: nach 1 Woche Inkubation bei pH 7,0 und 0,9 % Natriumchlorid-Gehalt (Kryo-TEM); (Proben jeweils 1:25 (v:v) vor der Messung verdünnt)

Abb. 107 veranschaulicht die resultierenden Aufnahmen des GHRH-Analogons nach zweistündiger bzw. einwöchiger Inkubation in Gegenwart von 25 mM L-Ascorbinsäure. Im linken Teil der Abbildung ist eindeutig zu erkennen, dass in diesem System nach 2 h keine ausgeprägten Fibrillen vorliegen, was die Befunde der Sondenbindungsuntersuchungen stützt, die besagen, dass in diesem Fall die amyloide Aggregation deutlich verringert wird. Im rechten Teil der Abbildung ist hingegen der gesamte Bereich der Aufnahme von einem dichten Netzwerk amyloider Fibrillen durchzogen, was nahelegt, dass der aggregationsinhibierende Effekt der L-Ascorbinsäure nach spätestens einer Woche nicht mehr nachweisbar ist.

Die korrespondierenden Ergebnisse in Gegenwart des Mischsystems aus 100 μ M Embonsäure und 1 % Benzylalkohol sind in Abb. 108 dargestellt. In diesem Fall sind bereits in der Probe nach 2 h fibrilläre Strukturen erkennbar, was zumindest für eine schwächere aggregations-

inhibierende Wirkung spricht als im Fall von L-Ascorbinsäure. Die Kryo-TEM-Aufnahme nach einer Woche zeigt überdies kugelförmige Objekte, die in der reinen TEM-Aufnahme nicht zu sehen sind. Es lässt sich plausiblerweise vermuten, dass es sich hierbei um Mizellen handelt, wie sie für das entsprechende Additiv-System bereits in Abschnitt 4.2.3.2 als wahrscheinlich formuliert werden.

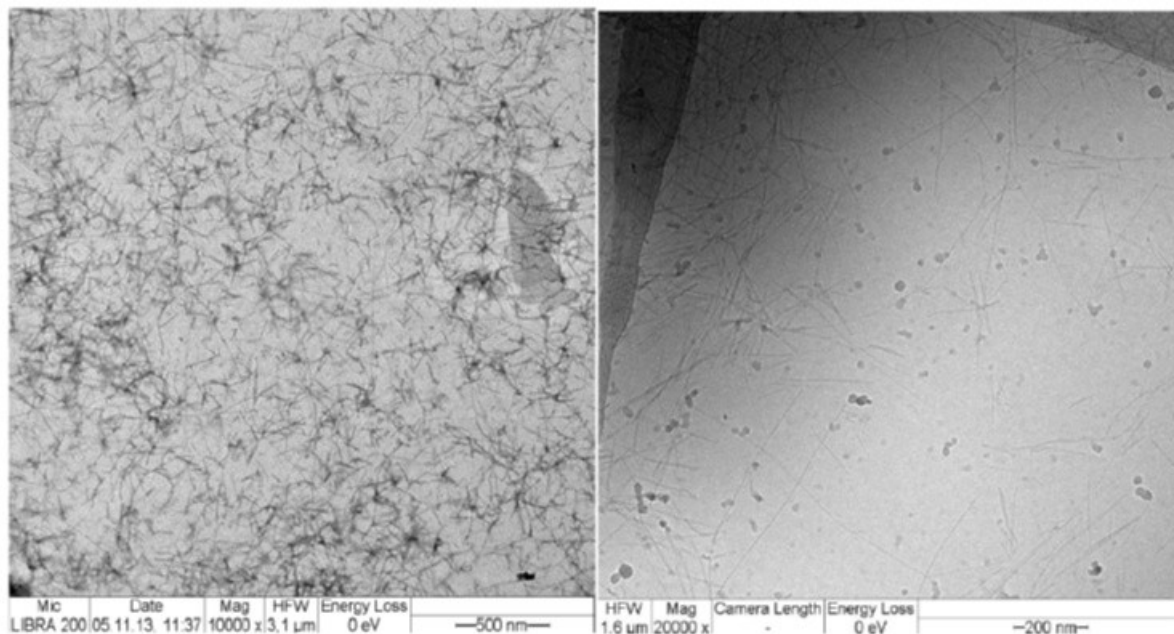


Abb. 108: TEM-Aufnahmen des GHRH-Analogons in Gegenwart von 100 μM Embonsäure und 1 % Benzylalkohol; links: nach 2 h Inkubation bei pH 7,0 und 0,9 % Natriumchlorid-Gehalt (TEM); rechts: nach 1 Woche Inkubation bei pH 7,0 und 0,9 % Natriumchlorid-Gehalt (Kryo-TEM); (Proben jeweils 1:25 (v:v) vor der Messung verdünnt)

4.2.5 NMR-spektroskopische 3D-Strukturbestimmung

4.2.5.1 3D-Struktur des GHRH-Analogons nach Peptidsyntheseverfahren 1

Mit dem Ziel einer NMR-spektroskopischen Untersuchung der Faltung des GHRH-Analogons im monomeren Zustand, wurde ein ausführliches Assignment aller ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -Signale erstellt, welches aufgrund gewisser Geheimhaltungsbestimmungen insbesondere in Hinblick auf die konkrete Sequenz des untersuchten GHRH-Analogons an dieser Stelle jedoch nicht explizit dargestellt werden kann.

Unter Nutzung des erstellten Assignments werden 3D-Strukturen des Peptides in DMSO-d_6 basierend auf $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOESY-Spektren analog zu dem Vorgehen im Fall von GnRH-Antagonisten berechnet. Die Untersuchung der Acetat-Form des Peptides gestaltet sich

außerordentlich schwierig, da in DMSO- d_6 im Verlauf weniger Tage die gemessenen Signale zunehmend breiter werden, sodass Messungen nur innerhalb der ersten 48 h nach Herstellen der Lösung durchführbar sind. Dieses Verhalten lässt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine rasche Aggregation des Acetatsalzes des Peptides zurückführen. Im Gegensatz dazu weisen entsprechende Proben des Trifluoracetates keine solche zeitabhängige Peak-Verbreiterung auf und können grundsätzlich bei einer deutlich höheren Signalintensität gemessen werden. Daher sind im Folgenden ausschließlich Resultate aus Untersuchungen an Trifluoracetaten des GHRH-Analogons dargestellt.

Die Strukturbestimmung einer Probe des GHRH-Analogons nach Peptidsyntheseverfahren 1 liefert stets dasselbe Ergebnis. Die statistischen Werte der entsprechenden Berechnung sind in Tabelle 30 zusammengestellt. Es fällt spontan ins Auge, dass der resultierende *Backbone RMSD* mit 3,70 Å extrem groß ist. Daher ist die erhaltene 3D-Struktur mit großen Unsicherheiten behaftet und kann lediglich dazu dienen, bestimmte Kontakte und grobe Strukturbildungen zu analysieren.

Tabelle 30: Zusammenstellung statistischer Kenngrößen des Ergebnisses der 3D-Strukturberechnung des GHRH-Analogons nach Peptidsyntheseverfahren 1 in DMSO- d_6

Parameter	Wert	Parameter	Wert
Anzahl finaler Strukturmodelle	20	Anzahl NOE restraints	107
Target function [Å ²]	1915,66 ± 0,29	- davon innerhalb derselben Seitenkette	45 (42,06 %)
Backbone RMSD [Å]	3,70 ± 0,76	- davon sequentiell ($ i-j = 1$)	35 (32,71 %)
Heavy atom RMSD [Å]	5,16 ± 0,66	- davon medium-range ($2 \leq i-j \leq 4$)	4 (3,74 %)
Anzahl zugeordneter Kreuzpeaks	251	- davon long-range ($5 \leq i-j $)	23 (21,50 %)

Die berechnete 3D-Struktur des Peptidrückgrates ist in Abb. 109 verdeutlicht. Insgesamt ergibt sich eine große Schleife, die durch intensive Kontakte zwischen dem hydrophoben N-Terminus des Peptides und einem Sequenzabschnitt His-Orn-Leu-Leu stabilisiert wird. Die dazugehörige Kontaktregion ist im rechten Teil von Abb. 109 im Detail dargestellt.

C-terminal von dieser Kontaktsequenz werden kaum noch NOE-Kontakte beobachtet, außer solchen, die innerhalb einer Seitenkette oder zwischen direkt benachbarten Seitenketten bestehen. Daher ist davon auszugehen, dass dieser Sequenzabschnitt stark gestreckt ist.

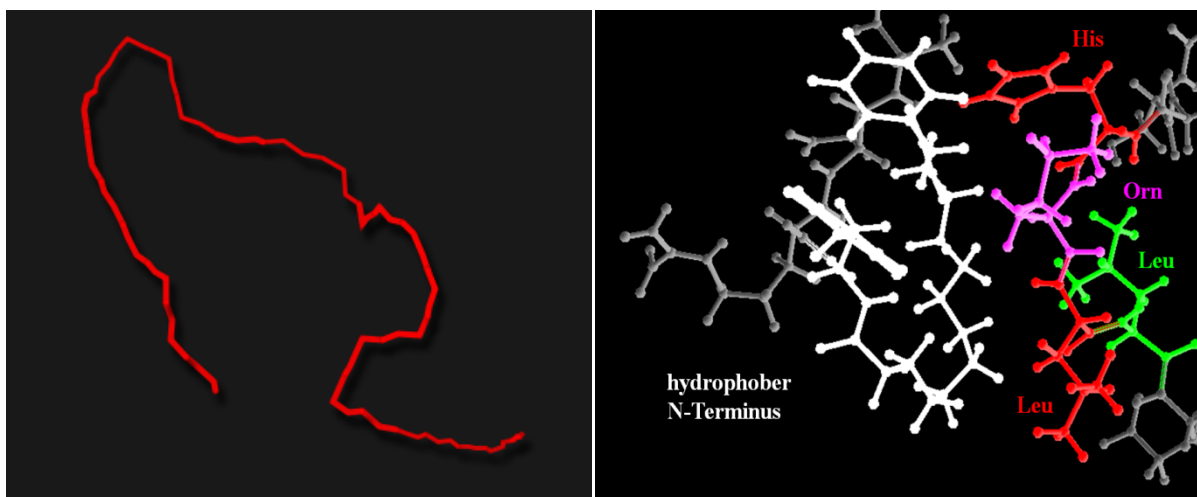


Abb. 109: Gemittelte Struktur des Peptidrückgrates (links) und Detailansicht der Kontaktregion für die Schleifenbildung (rechts) des GHRH-Analogons nach Peptidsyntheseverfahren 1 in DMSO-d₆

4.2.5.2 3D-Struktur des GHRH-Analogons nach Peptidsyntheseverfahren 2

Für die 3D-Struktur des GHRH-Analogons nach Peptidsyntheseverfahren 2 werden bei wiederholten Messungen stets zwei verschiedene Varianten berechnet, zwischen denen nicht eindeutig unterschieden werden kann.

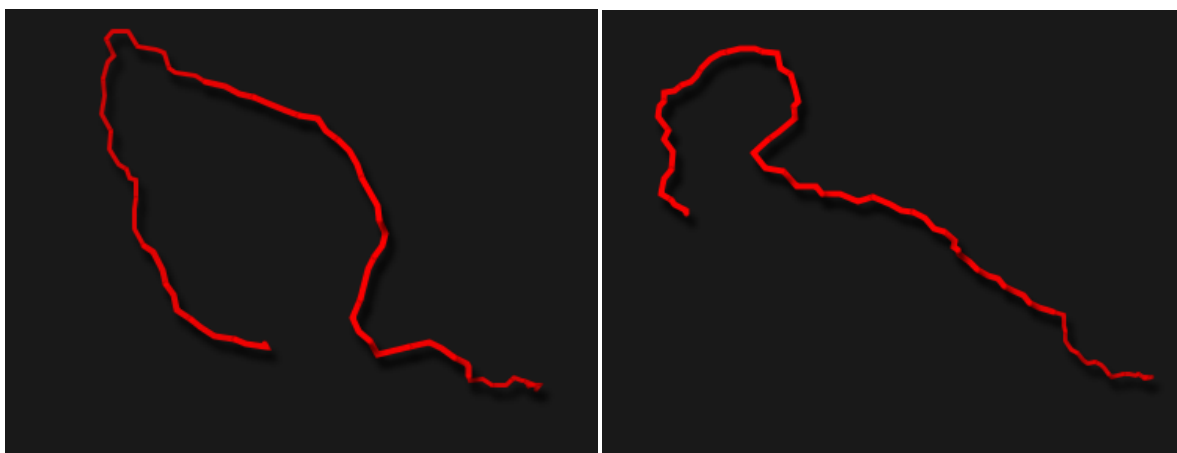


Abb. 110: Gemittelte Struktur des Peptidrückgrates für Strukturvariante 1 (links) und Strukturvariante 2 (rechts) des GHRH-Analogons nach Peptidsynthesevariante 2 in DMSO-d₆

Die gemittelten Rückgratstrukturen der beiden Strukturvarianten sind in Abb. 110 einander gegenübergestellt. In beiden Fällen wird die Bildung einer Schleife zwischen dem hydrophoben N-Terminus des Peptides und einem bestimmten Kontaktsequenzabschnitt

beobachtet, während die Kontaktsequenz im Falle der Strukturvariante 1 identisch zu derjenigen aus Abb. 109 ist, befindet sich die entsprechende Kontaktsequenz im Fall der Strukturvariante 2 deutlich näher am N-Terminus, weshalb eine viel kleinere Schleife entsteht.

Die statistischen Kenngrößen beider Strukturvarianten sind nahezu identisch und können dem Anhang in Abschnitt 10.3 in Form der Tabellen A13 und A14 entnommen werden.

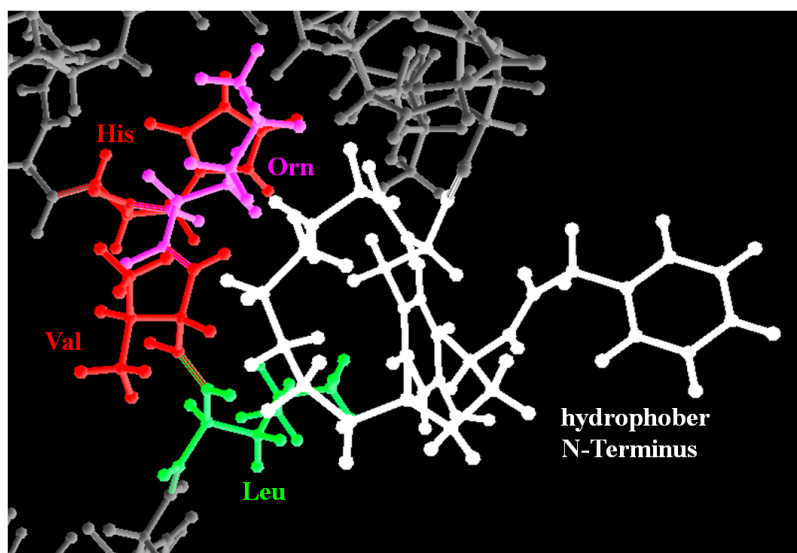


Abb. 111: Detailansicht der Kontaktregion für die Schleifenbildung im Fall der beobachteten Strukturvariante 2 des GHRH-Analogons nach Peptidsyntheseverfahren 2 in DMSO-d₆

Die abweichende Kontaktregion der Strukturvariante 2 ist in Abb. 111 veranschaulicht. Offenkundig handelt es sich um eine sehr ähnliche Sequenz im Vergleich zu der Sequenz aus Abb. 109. Die betreffende Aminosäureabfolge lautet für die beiden Fälle:

Strukturvariante 1:	His	Orn	Leu	Leu
Strukturvariante 2:	His	Orn	Val	Leu

Die Seitenkettensignale dieser identischen oder zumindest sehr ähnlichen Aminosäuren lassen sich mit den verwendeten Mitteln nur schwer eindeutig voneinander unterscheiden. Sequenzspezifische Signale, wie etwa die ¹H-Signale der betroffenen α-CH-Gruppierungen bestätigen jedoch, dass beide Varianten vorkommen, so dass es sich in diesem Fall höchst wahrscheinlich um verschiedene, nebeneinander existierende Faltungsformen des Peptides handelt.

4.3 Trennung und Charakterisierung der Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* zur Gewinnung von Partnermolekülen für die Komplexierung von GnRH-Antagonisten

4.3.1 Chromatographische Trennung der Gallotanninmischung

4.3.1.1 Optimierte Stufenelutionsverfahren an Sephadex LH-20

Aus den bisher dargestellten Ergebnissen wird klar ersichtlich, dass die starke Tendenz von GnRH-Antagonisten zur Bildung amyloider Fibrillen bei der Erzeugung geeigneter *Drug delivery*-Systeme in Hinblick auf eine hohe Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes dringend berücksichtigt werden muss. Es ergibt sich daher die Notwendigkeit, geeignete Inhibitoren dieser Amyloidbildung zu identifizieren und als potentielle Partnermoleküle zu gewinnen (vgl. Abschnitt 1.2.2), wobei insbesondere aufgrund der diesbezüglich seit langem bekannten, vielversprechenden Effekte der Leitstruktur EGCG die Gruppe der Tannine ein großes Potential verspricht (vgl. Abschnitt 1.4.3). Die Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* besteht aus einer Vielzahl strukturverwandter Tannine und bietet daher, bei geeigneter Trennung und Charakterisierung der enthaltenen Verbindungen, potentiell die Möglichkeit, die anti-amyloide Wirkung tiefgründiger zu untersuchen und dabei ggf. Struktureigenschaftsbeziehungen ableiten zu können, die einer gezielten Entwicklung pharmazeutisch einsetzbarer *Drug delivery*-Formulierungen von GnRH-Antagonisten und weiteren amyloidbildender Peptidwirkstoffen Vorschub leisten würden.

Als erster Schritt zur Trennung des komplexen Gemisches dient in der vorliegenden Arbeit ein spezieller Chromatographieschritt. Das dabei verwendete Säulenmaterial Sephadex LH-20 ist eine propylierte Variante von Sephadex G-25 und weist aufgrund dieser Modifikation eine gewisse Stabilität gegenüber organischen Lösemitteln auf, wodurch eine Elution eines adsorbierten Polyphenolgemisches mithilfe von Ethanol/Wasser/Aceton-Gemischen möglich ist. Das genannte Säulenmaterial, welches grundsätzlich für den Einsatz in der Gelchromatographie entwickelt wurde, dient daher im vorliegenden Fall als stationäre Phase für eine Adsorptionschromatographie. In Hinblick auf die Trennung von Tanninen verwenden beispielsweise TIAN ET AL., 2009 einen linearen Aceton-Gradienten in einem Ethanol/Wasser/Aceton-Gemisch, um einzelne Fraktionen einer Gallotanninmischung von Sephadex LH-20 zu eluieren. Basierend auf diesem Ansatz entwickelte B.Sc. J. Bergmann im Rahmen ihrer Bachelorarbeit [Bergmann, 2013] im Rahmen des vorliegenden Projektes ein optimiertes Stufenelutionsverfahren zur Auftrennung der verwendeten Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis*, welches in der vorliegenden Arbeit zur präparativen Gewinnung von

Tanninfraktionen als Komplexpartner für GnRH-Antagonisten Anwendung findet (siehe Abschnitt 3.12.1).

Ein zentrales Problem dieses Verfahrens besteht in der Detektion der eluierten Tanninspezies, da sich aufgrund des hohen und zugleich zeitlich inkonstanten Acetongehaltes des Laufmittels klassische *online*-Detektionsvarianten, wie etwa Brechungsindexdetektoren oder ein UV-Detektor bei 217 nm, nicht anwenden lassen. Die zur Erstellung des korrespondierenden Chromatogramms notwendige Quantifizierung der zeitabhängig eluierten Tanninanteile erfolgt deshalb unter Nutzung des Verfahrens zur Phenolgehaltsbestimmung aus Abschnitt 3.11 in den gesammelten Fraktionen. Das auf diesem Wege für das optimierte Elutionsprogramm resultierende Chromatogramm ist in Abb. 112 dargestellt, wobei die anschließend vereinigten Fraktionen farblich gekennzeichnet sind.

Diejenigen Fraktionen, welche freie Gallussäure enthalten, eluieren nach ca. 130 min und sind in Abb. 112 grau dargestellt. Die Abgrenzung zwischen den einzelnen Fraktionen, die zu den Tanninfraktionen TaF1 - TaF4 zugeordnet werden, erfolgt zwischen den Tanninfraktionen TaF1 und TaF2 bzw. zwischen TaF2 und TaF3 an der Stelle eines auftretenden lokalen Minimums im Chromatogramm, wohingegen für die Abgrenzung zwischen den Tanninfraktionen TaF3 und TaF4 das globale Maximum als Trennungsstelle gewählt wird.

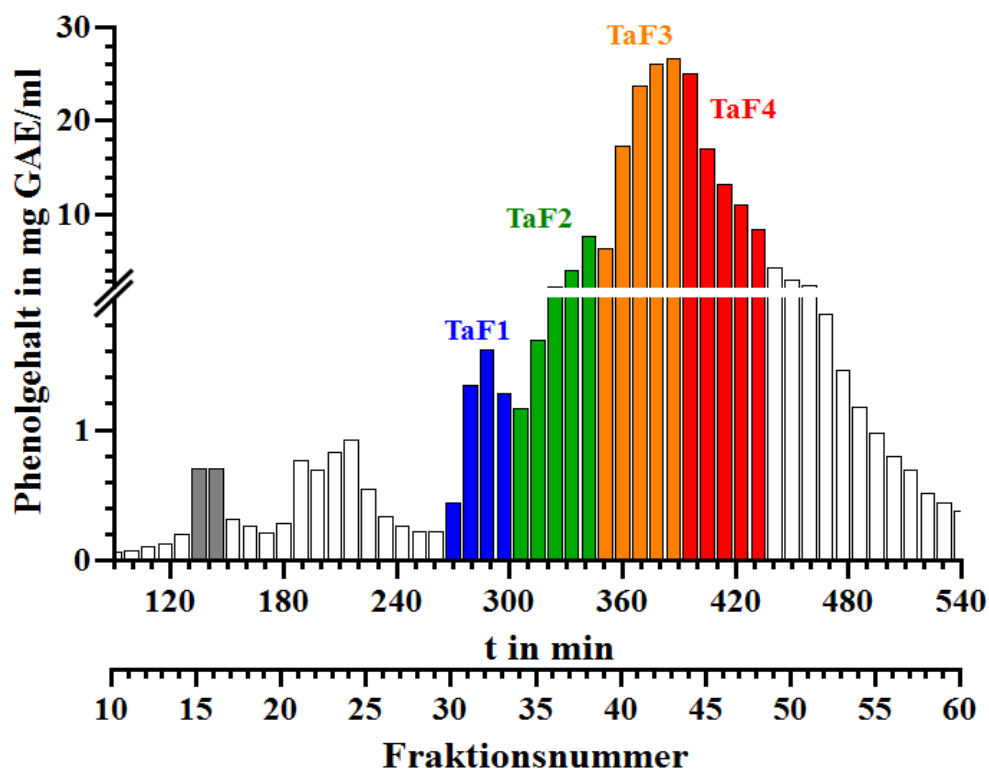


Abb. 112: Chromatogramm der optimierten Stufentrennung der Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* an Sephadex LH-20; vereinigte Fraktionen farblich gekennzeichnet und mit der im Folgenden verwendeten Bezeichnung der Tanninfraktionen TaF1 - TaF4 beschriftet

Diese bereits von B.Sc. J. Bergmann vorgenommene Einteilung wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit mithilfe analytischer HPLC der einzelnen Fraktionen näher auf ihre Plausibilität untersucht. Dafür sind in Abb. 113 die analytischen HPLC-Chromatogramme der in Abb. 112 farblich gekennzeichneten Fraktionen dargestellt. Die Fraktionen, die anschließend zu der Tanninfraktion TaF1 vereinigt werden, weisen offensichtlich einheitlich einen dominanten Peak bei 18,0 min auf, während die zu TaF2 vereinigten Fraktionen einen dominanten Peak bei 21,5 min zeigen. Lediglich Fraktion 34 beinhaltet beide Peaks gleichzeitig in nennenswertem Umfang. Daher erscheint die vorgenommene Einteilung Tanninfraktionen TaF1 und TaF2 in Anbetracht der enthaltenen Tanninspezies als sinnvoll. Für die Tanninfraktionen TaF3 und TaF4 wird hingegen eine mehr oder weniger kontinuierliche Verschiebung einer stets breiten Peakgruppierung zu höheren Retentionszeiten beobachtet, was nahelegt, dass in diesen Fällen eine eindeutige Separierung bestimmter Tanninspezies voneinander kaum möglich ist und daher in jedem Fall nur eine Unterteilung in Pools mit einem Schwerpunkt bei schwächer bzw. stärker retardierten Tanninspezies erreichbar scheint. Weil demzufolge jedwede Unterteilung zwischen den Tanninfraktionen TaF3 und TaF4 willkürlich sein muss, erscheint die bereits von B.Sc. J. Bergmann vorgenommene Trennung am Maximum des Chromatogrammes aus Abb. 112 sinnvoll.

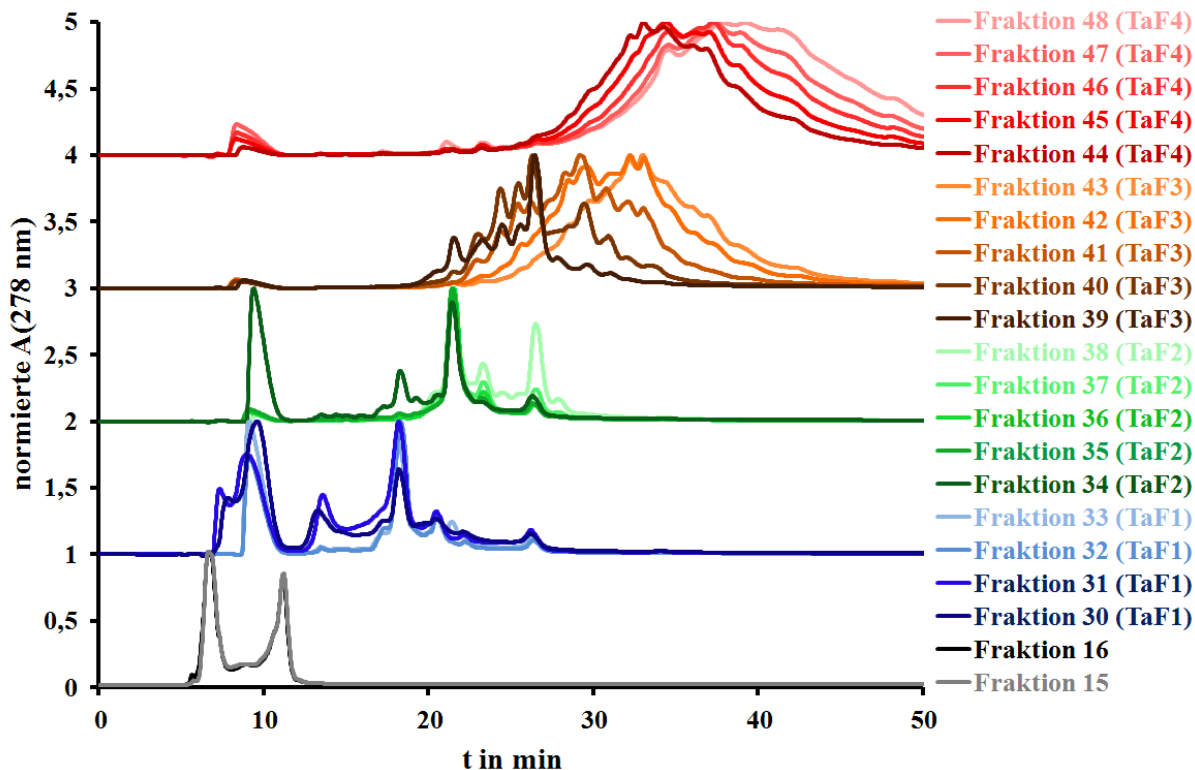


Abb. 113: Analytische HPLC-Chromatogramme der einzelnen Fraktionen aus der Stufentrennung der Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* an Sephadex LH-20; HPLC-Parameter gemäß Abschnitt 3.15 Programm für Methanolyseprodukte)

4.3.1.2 LC-MS/MS-Untersuchungen zur Zusammensetzung der aus der Stufenelution resultierenden Tanninfraktionen TaF1 - TaF4

LC-MS/MS-Messungen zur näheren Analytik der Zusammensetzung der Tanninfraktionen TaF1 - TaF4 erfolgen nach Abschnitt 3.16.1 für jede Tanninfraktion mit einem eigens optimierten HPLC-Programm. Die Potentiale sind dabei so gewählt, dass ausschließlich Molekülonen, aber keine Fragmentierungsprodukte detektiert werden.

Abb. 114 zeigt für TaF1 den summarischen Verlauf aller Masse/Ladungs-Verhältnisse des untersuchten Bereiches (*TIC: total ion current*), sowie die extrahierten Verläufe einzelner Masse/Ladungs-Verhältnisse wesentlicher Tanninspezies (*XIC: extracted-ion current*). Neben den Hydrolyseprodukten Gallussäure und Digallussäure sind Galloylglukosen mit einer einzigen Gallussäureeinheit (1GG) bis hin zu 4 Gallussäureeinheiten (4GG) detektierbar. Für das charakteristische Masse/Ladungsverhältnis einer Monogalloylglukose ($m/z = 331$) werden jedoch gleich 5 deutlich voneinander getrennte Peaks erhalten, was darauf hindeutet, dass bei dieser Art der Chromatographie die einzelnen Konstitutionsisomere der Galloylglukose unterschiedlich stark verzögert und infolgedessen getrennt voneinander eluiert werden. Trigalloylglukosen bilden offenkundig den Hauptbestandteil der Tanninfraktion TaF1.

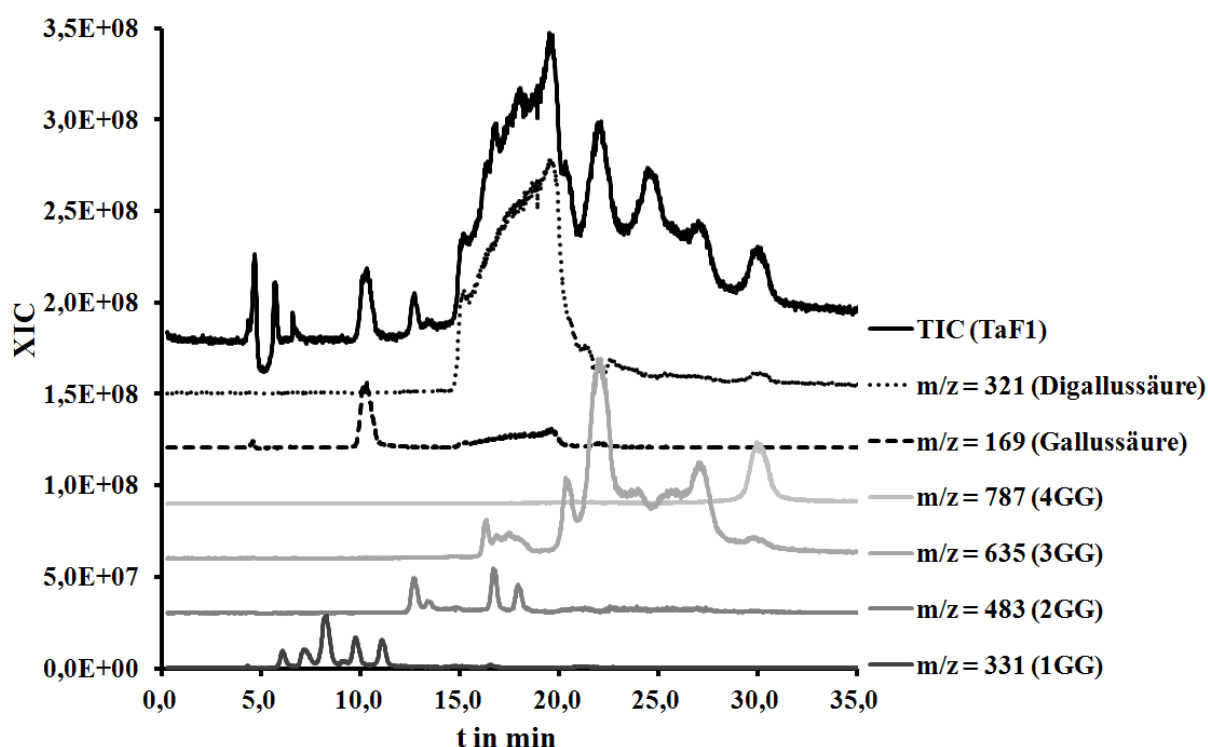


Abb. 114: TIC- und ausgewählte XIC-Chromatogramme der Tanninfraktion TaF1

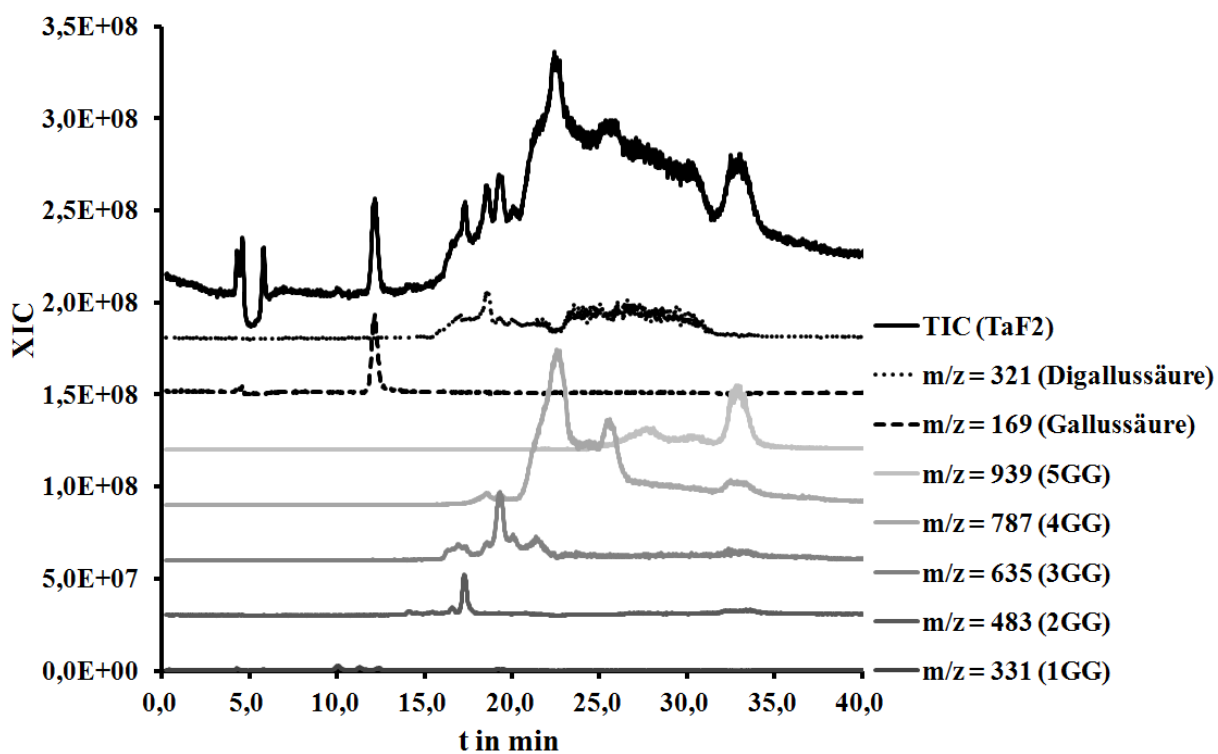


Abb. 115: TIC- und ausgewählte XIC-Chromatogramme der Tanninfraktion TaF2

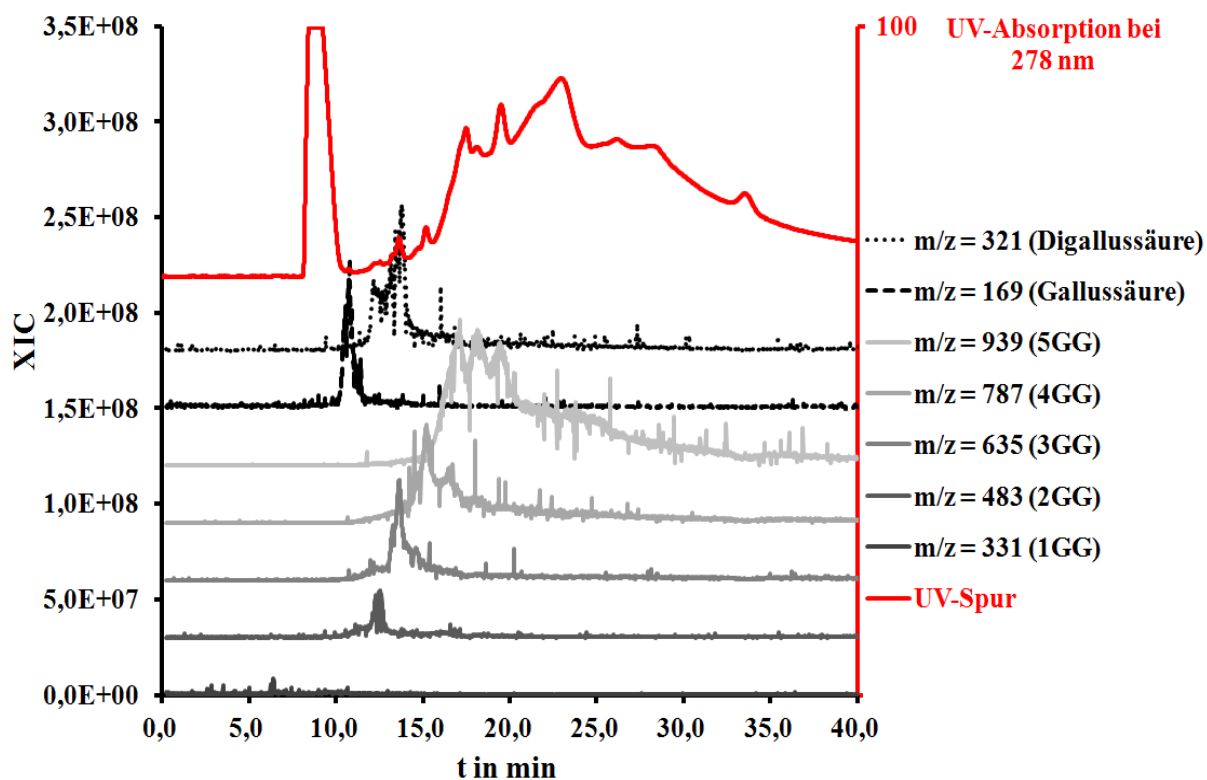


Abb. 116: UV-Spur und ausgewählte XIC-Chromatogramme der Tanninfraktion TaF3 für Masse/Ladungsverhältnisse < 1000

Der TIC- und ausgewählte XIC-Verläufe der LC-MS/MS-Untersuchung von Tanninfraktion TaF2 sind in Abb. 115 zu sehen. In diesem Fall werden kaum Mono- und Digalloylglukosen detektiert. Der Schwerpunkt liegt in dieser Tanninfraktion bei Tetragalloylglukosen, die aufgrund der breiten Peakform mit mehreren Maxima offensichtlich als Isomerengemisch auftreten. Die größte nachweisbare Spezies ist mit 5 Gallussäureeinheiten verestert und könnte aufgrund der Peaksymmetrie einem einzelnen Isomer entsprechen.

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse zur Zusammensetzung der Tanninfraktionen TaF3 und TaF4 wurden im Rahmen eines Praktikums von B.Sc. P. Körner erarbeitet. Anstelle des TIC wird aufgrund verbesserter instrumenteller Möglichkeiten die parallel aufgenommene UV-Spur bei 278 nm mit angegeben.

Abb. 116 zeigt zunächst die XIC-Chromatogramme der Tanninfraktion TaF3 für Galloylglukosen mit 1 - 5 Gallussäureeinheiten. Die verschiedenen Spezies eluieren mit steigendem Galloylierungsgrad stärker verzögert, bilden dabei jedoch breite Peakgruppen, die einander teilweise überlagern. Der Schwerpunkt scheint in dieser Tanninfraktion bei Pentagalloylglukosen (5GG) zu liegen. Grundsätzlich ist die Zusammensetzung jedoch uneinheitlicher als in den Tanninfraktionen TaF1 und TaF2. Abb. 117 zeigt überdies, dass auch höher galloylierte Glukosen bis hin zu Veresterungsprodukten mit mindestens 8 Gallussäureeinheiten (8GG) nachweisbar sind.

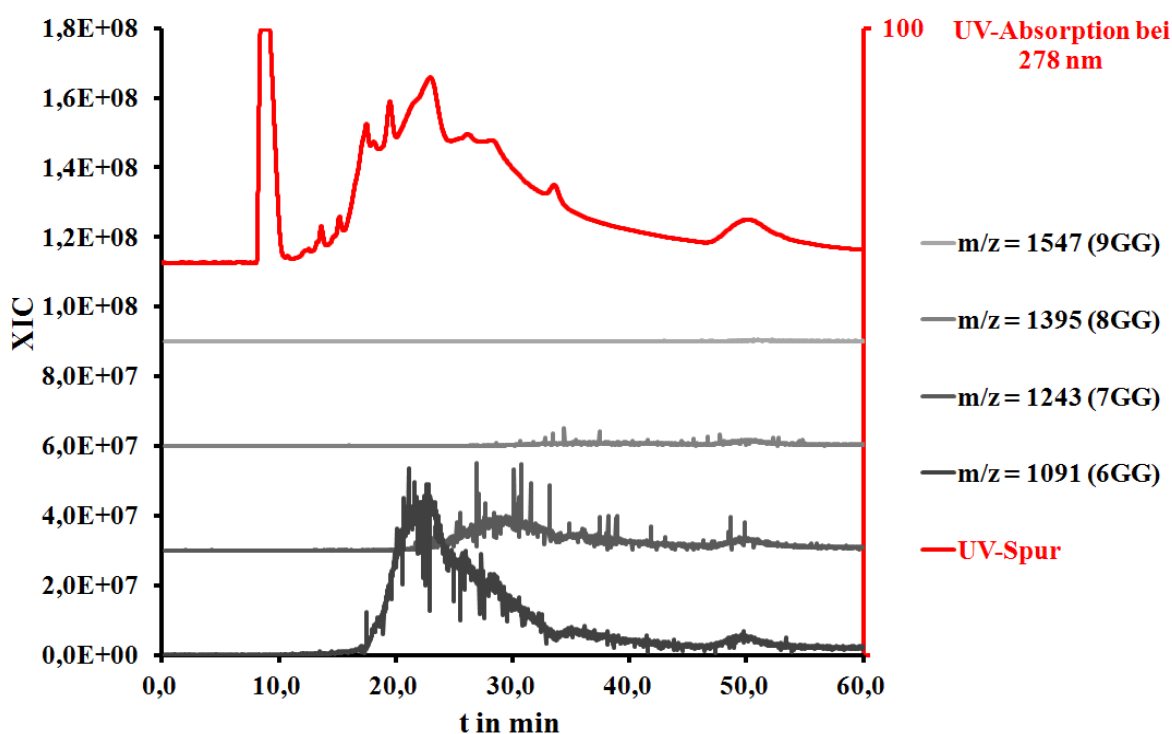


Abb. 117: UV-Spur und ausgewählte XIC-Chromatogramme der Tanninfraktion TaF3 für Masse/Ladungsverhältnisse > 1000

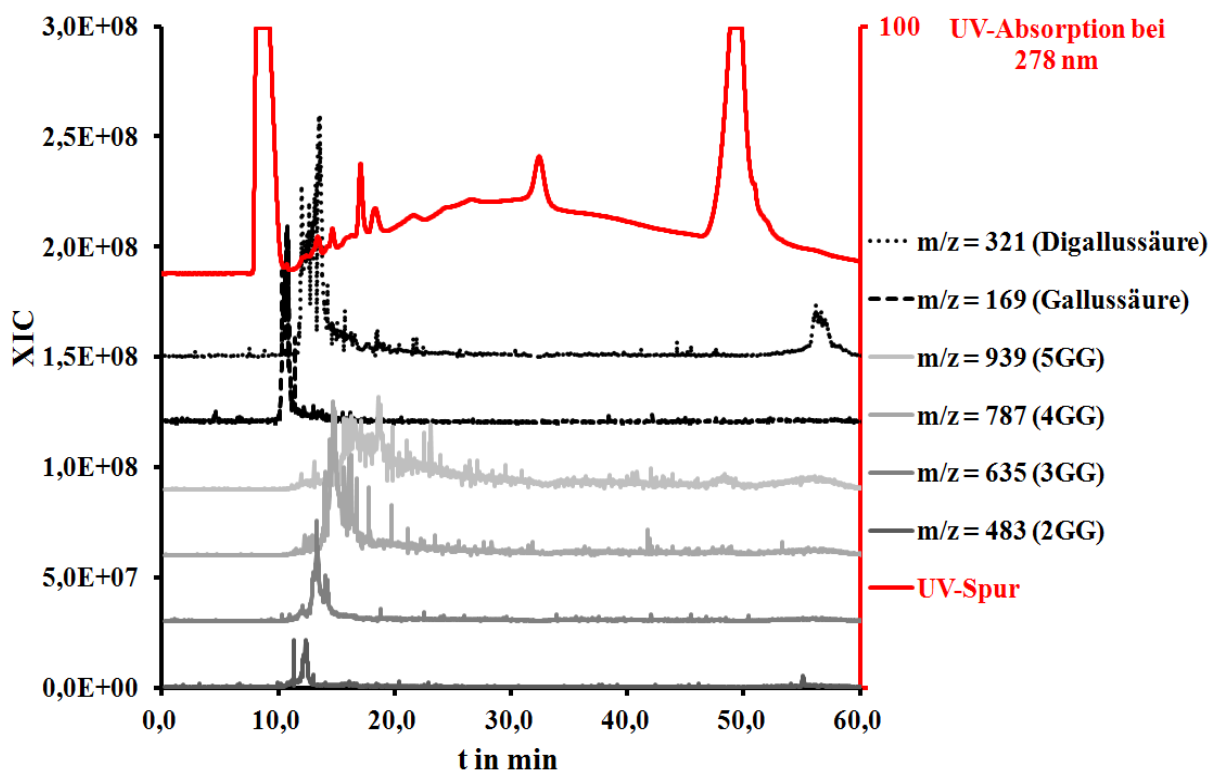


Abb. 118: UV-Spur und ausgewählte XIC-Chromatogramme der Tanninfraktion TaF4 für Masse/Ladungsverhältnisse < 1000

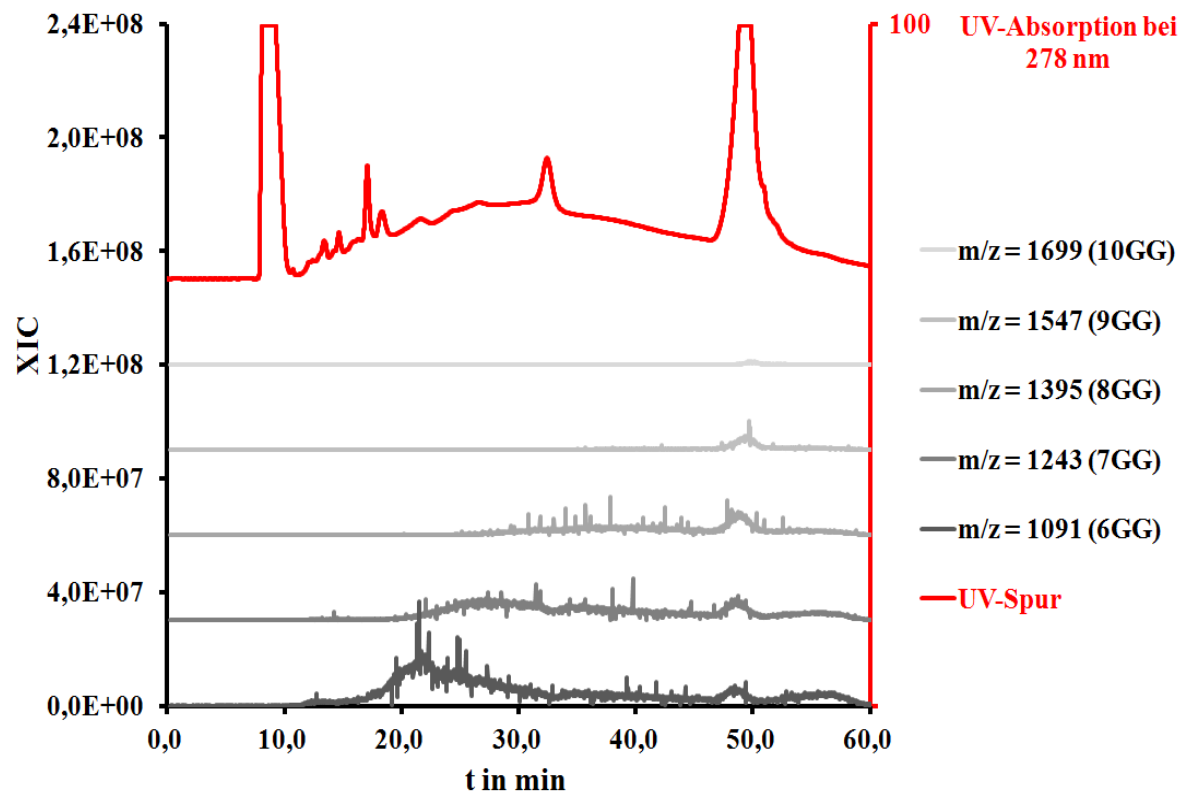


Abb. 119: UV-Spur und ausgewählte XIC-Chromatogramme der Tanninfraktion TaF4 für Masse/Ladungsverhältnisse > 1000

Die korrespondierenden Analyseergebnisse der Tanninfraktion TaF4 sind in Abhängigkeit vom betrachteten Bereich des Masse/Ladungsverhältnisses in Abb. 118 und Abb. 119 veranschaulicht. Die Zusammensetzung von TaF4 ist breitgefächert und reicht von Digalloylglukosen (2GG) bis hin zu Dekagalloylglukosen (10GG). Ein eindeutiger Schwerpunkt ist insbesondere aufgrund möglicher Unterschiede in der Ionisierungseffizienz nicht auszumachen, auch wenn ein großer Anteil an Tetra-, Penta- und Hexagalloylglukosen beobachtet wird.

4.3.1.3 Verfahrensoptimierung zur weiteren semi-präparativen HPLC-Trennung der aus der Stufenelution erhaltenen Tanninfraktionen TaF1 - TaF4

Um eine weiterführende Auftrennung der Tanninfraktionen aus der Stufenelution an Sephadex LH-20 zu erreichen, wurden in der im Rahmen des vorliegenden Projektes angefertigten Bachelorarbeit von B.Sc. C. Grundmann optimierte Trennverfahren mithilfe semi-präparativer HPLC an einer RP 8-Säule entwickelt [Grundmann, 2014]. Die dabei final erhaltenen Trennergebnisse, sowie die auf diesem Wege im semi-präparativen Maßstab gewonnenen Teilfraktionen sollen an dieser Stelle kurz skizziert werden. Die Parameter der Trennung sind Abschnitt 3.12.2 zu entnehmen.

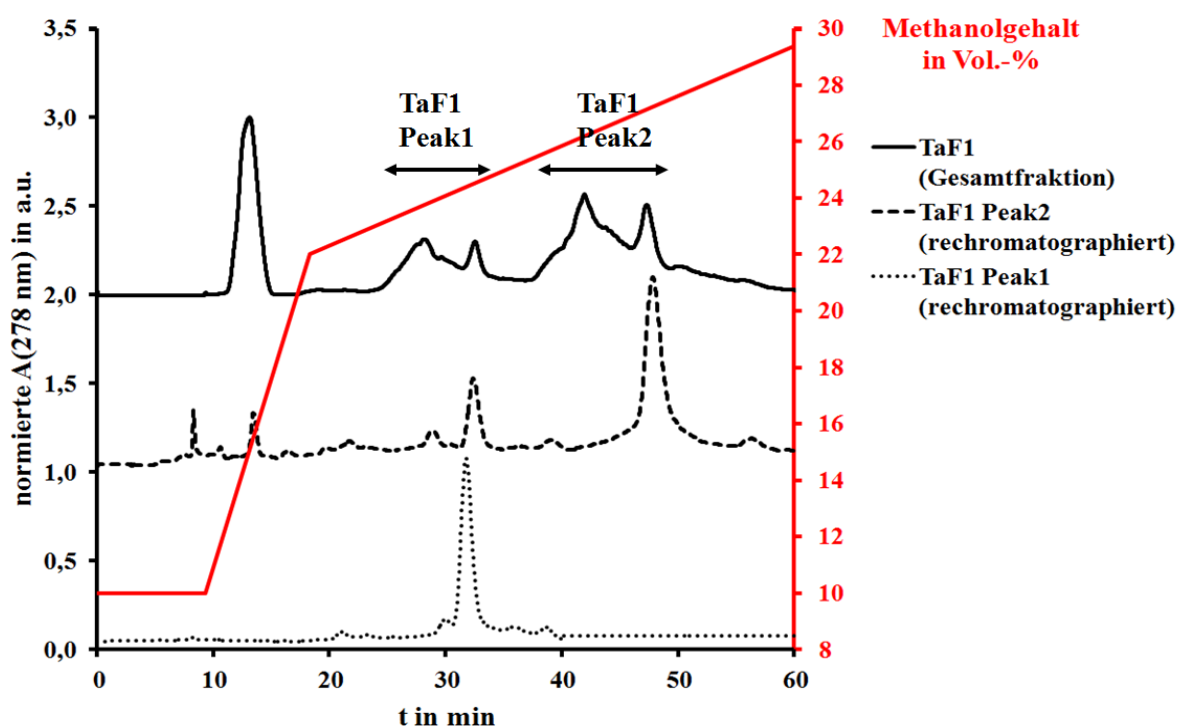


Abb. 120: Semi-präparatives HPLC-Chromatogramm der Tanninfraktion TaF1, sowie Rechromatogramme der gewonnenen Teilfraktionen TaF1_Peak1 und TaF1_Peak2

Für Tanninfraktion TaF1 ist das Chromatogramm der semi-präparativen Trennung samt der Rechromatogramme der isolierten Teilfraktionen TaF1_Peak1 und TaF2_Peak2 in Abb. 120 dargestellt. Es ergeben sich zwei basislinien-separierte Peakgruppen, deren gesammelte Fraktionen zu den Tanninteilfraktionen TaF1_Peak1 und TaF1_Peak2 zusammengefasst werden. Bei der Rechromatographie fällt auf, dass in der später eluierenden Teilfraktion zu einem gewissen Anteil auch der Peak der früher eluierenden Teilfraktion als Verunreinigung auftritt. Aufgrund der Basislinientrennung zwischen beiden Peakgruppen ist hierbei eher davon auszugehen, dass diese Spezies durch Hydrolyse vor der Rechromatographie neu entsteht, als dass diese Spezies bereits in den ursprünglich vereinigten Teilfraktionen der semi-präparativen Trennung enthalten ist.

Das Trennergebnis der Tanninfraktion TaF2 ist in Abb. 121 visualisiert. In diesem Fall zeigt sich eine breite Peakgruppe, welche annähernd äquidistant in 3 Teilfraktionen unterteilt wird.

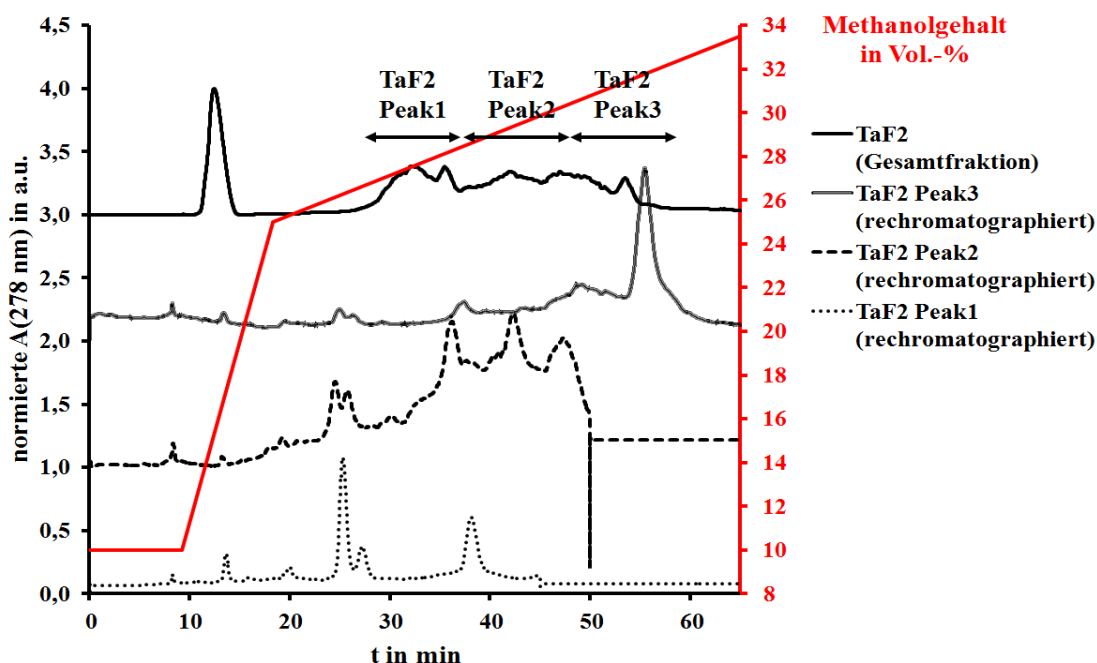


Abb. 121: Semi-präparatives HPLC-Chromatogramm der Tanninfraktion TaF2, sowie Rechromatogramme der gewonnenen Teilfraktionen TaF2_Peak1, TaF2_Peak2 und TaF2_Peak3

Die semi-präparative Trennung der Tanninfraktion TaF3 ist in Abb. 122 veranschaulicht. In diesem Fall führt die Aufteilung einer breiten Peakgruppe mit einem zentralen Maximum zu drei Teilfraktionen mit gegeneinander verschobenen Schwerpunkten, die sich jedoch gegenseitig stark überschneiden. Daher ist in diesem Fall nur von einer selektiven Anreicherung bestimmter Spezies in den Teilfraktionen zu sprechen, aber keineswegs von einer eindeutigen Trennung.

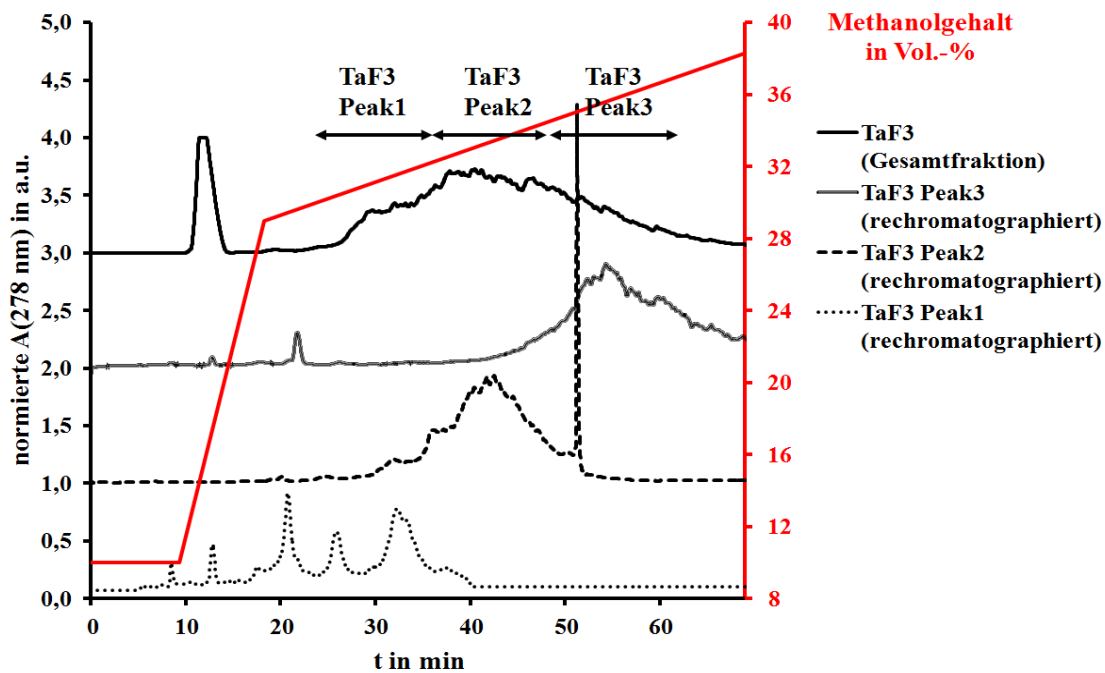


Abb. 122: Semi-präparatives HPLC-Chromatogramm der Tanninfraktion TaF3, sowie Rechromatogramme der Teilfraktionen TaF3_Peak1, TaF3_Peak2 und TaF3_Peak3

Die Gewinnung der Teilfraktionen von Tanninfraktion TaF4 wird in Abb. 123 gezeigt. Auch hier wird innerhalb der 3 Teilfraktionen lediglich eine Anreicherung bestimmter Komponenten, aber keinesfalls eine klare Trennung realisiert.

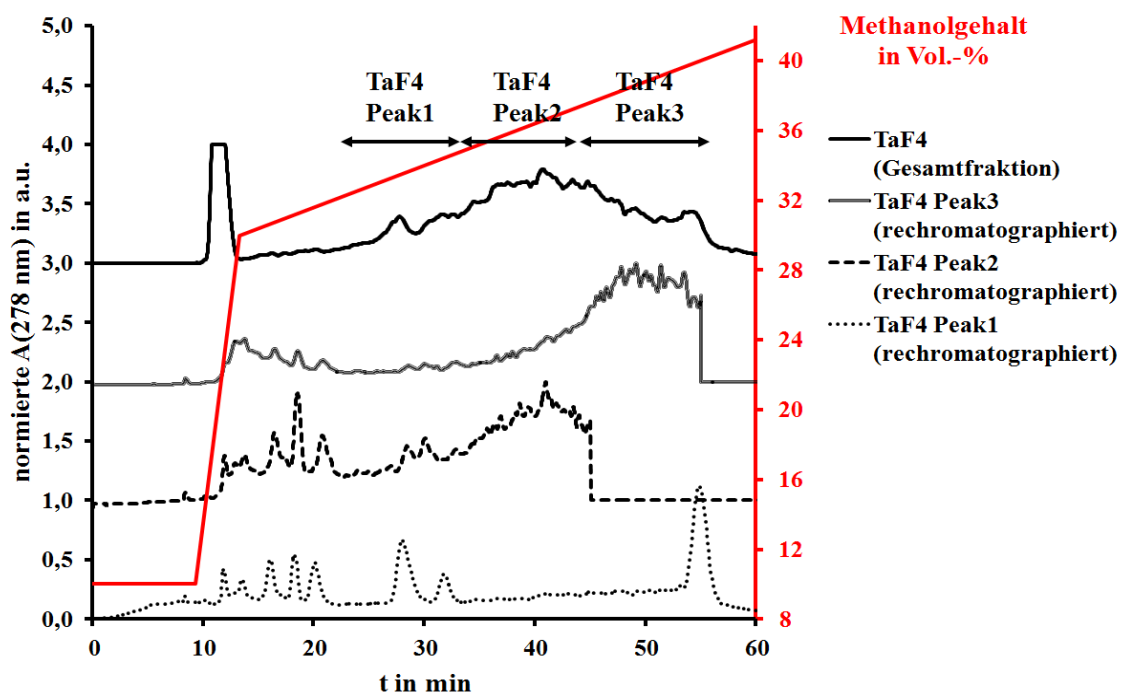


Abb. 123: Semi-präparatives HPLC-Chromatogramm der Tanninfraktion TaF4, sowie Rechromatogramme der gewonnenen Teilfraktionen TaF4_Peak1, TaF4_Peak2 und TaF4_Peak3

4.3.2 Methanolytische Gewinnung von Reinsubstanzen aus der Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis*

4.3.2.1 Produkte der Methanolyse der Gallotanninmischung

Die Methanolyse der Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* wurde im Rahmen eines Praktikums von B.Sc. P. Körner in der Arbeitsgruppe etabliert und für die präparative Gewinnung einzelner reiner Tanninspezies verwendet.

Durch die in Abschnitt 3.13.1 beschriebene Behandlung der Gallotanninmischung mit einer methanolischen Lösung bei pH 5,0 und bei 75 °C erfolgt eine selektive Spaltung der Depsidbindungen zwischen den phenolischen OH-Gruppen der Gallussäureeinheiten und den Carbonsäuregruppen peripherer, damit veresterter Gallussäureeinheiten, wohingegen die Esterbindungen unter Beteiligung der aliphatischen OH-Gruppen der zentralen Glukose erhalten bleiben.

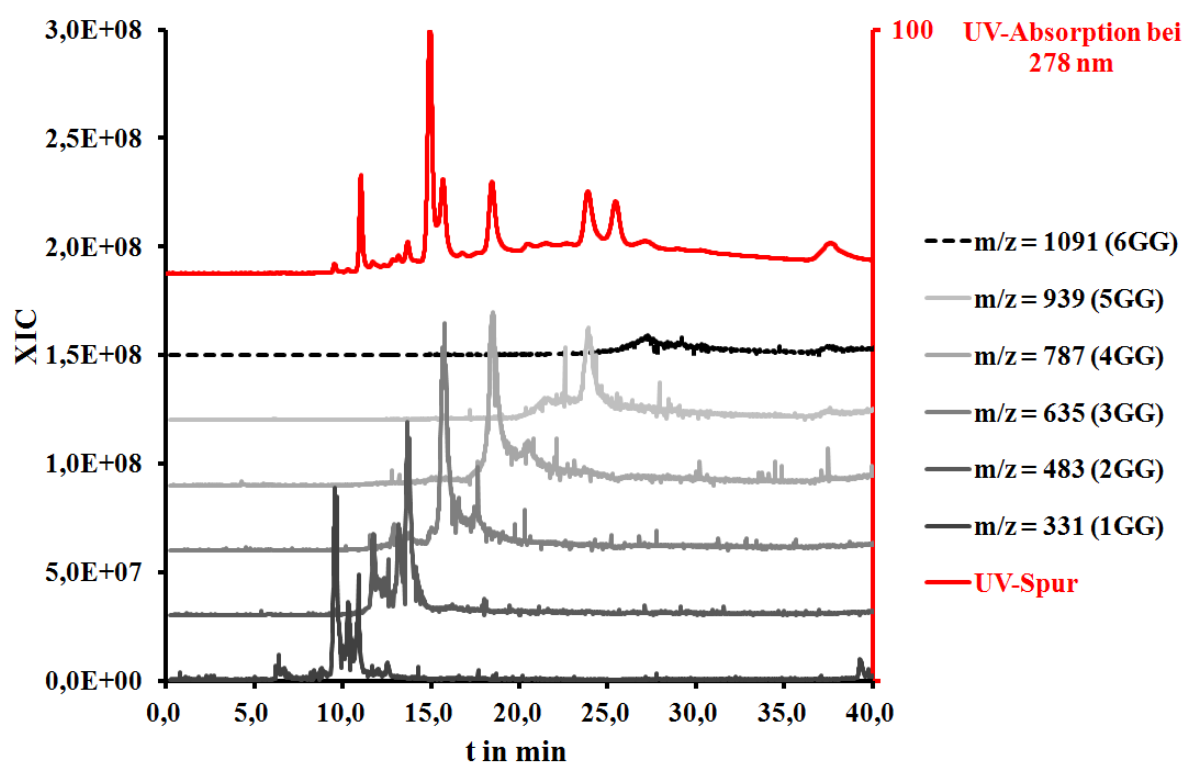


Abb. 124: UV-Spur und XIC-Chromatogramme der methanolytisch gewonnenen Galloylglukosen nach einer Reaktionszeit von 6 h (Chromatogramme normiert)

Abb. 124 zeigt das LC-MS/MS-Chromatogramm der dabei entstehenden Galloylglukosen nach einer Reaktionszeit von 6 h. Die stark vergrößert dargestellten Mono- und Digalloylglukosen weisen mehrere Peaks auf und liegen daher als Isomerengemisch vor. Für

Tri-, Tetra- und Pentagalloylglukosen wird aber jeweils ein einzelner dominanter Peak beobachtet, was für die Bildung einer bestimmten Isomerenform spricht. Für Pentagalloylglukose kommt dafür aufgrund des beschriebenen Grundprinzips der Methanolyse ausschließlich 1,2,3,4,6-O-Pentagalloylglukose (PGG) in Frage, weshalb diese Abkürzung im Folgenden Verwendung findet, um das konkrete Isomer zu bezeichnen. Für die gefundene Tri- bzw. Tetragalloylglukose kommen jedoch mehrere Varianten in Frage, sodass keine spezifische Bezeichnung an dieser Stelle erfolgen kann.

In Abb. 124 fallen neben den Peaks für die genannten Galloylglukosen noch weitere Signale in der UV-Spur auf, die noch nicht durch eine der angegebenen XIC-Spuren erklärt werden. Diese Signale sind in Abb. 125 mit den dazugehörigen Masse/Ladungsverhältnissen dargestellt. Das Auftreten von Gallussäure und Methylgallat (Gallussäuremethylester) sind mechanistisch problemlos verständlich. Die Verbindungen mit $m/z = 680$ bzw. 487 sind hingegen nicht trivial zu erklären. Interessanterweise treten diese Spezies nur als Übergangsformen während der Methanolyse auf, deren Intensität zunächst zeitlich zu und später wieder abnimmt, wie B.Sc. P. Körner zeigen konnte. Nach 24 h Reaktionszeit sind sie nicht mehr nachweisbar und die entsprechenden Peaks fehlen im Chromatogramm.

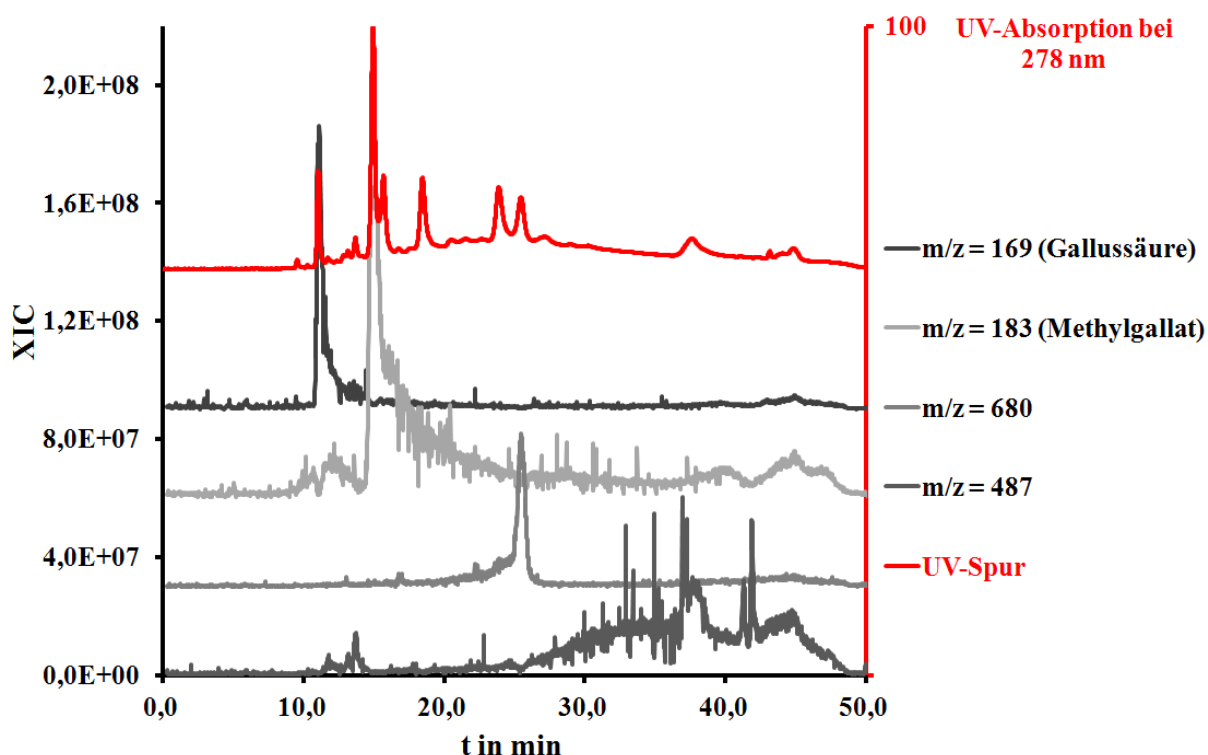


Abb. 125: UV-Spur und XIC-Chromatogramme der übrigen bei der Methanolyse entstehenden Verbindungen nach einer Reaktionszeit von 6 h (Chromatogramme normiert)

4.3.2.2 LC-MS/MS-Untersuchungen zu der unbekannten Substanz mit $m/z = 680$ und zu abgeleiteten Alkoholysen mit Ethanol und *n*-Propanol

Um die molekulare Struktur der im vorhergehenden Abschnitt erwähnten Verbindung mit einem Masse/Ladungsverhältnis von 680, die intermediär im Verlauf der Methanolyse der Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* auftritt, besser verstehen zu können, wird ein Tochterionen-Scan für dieses Teilchen durchgeführt. Das dabei erhaltene Massenspektrum ist in Abb. 126 wiedergegeben.

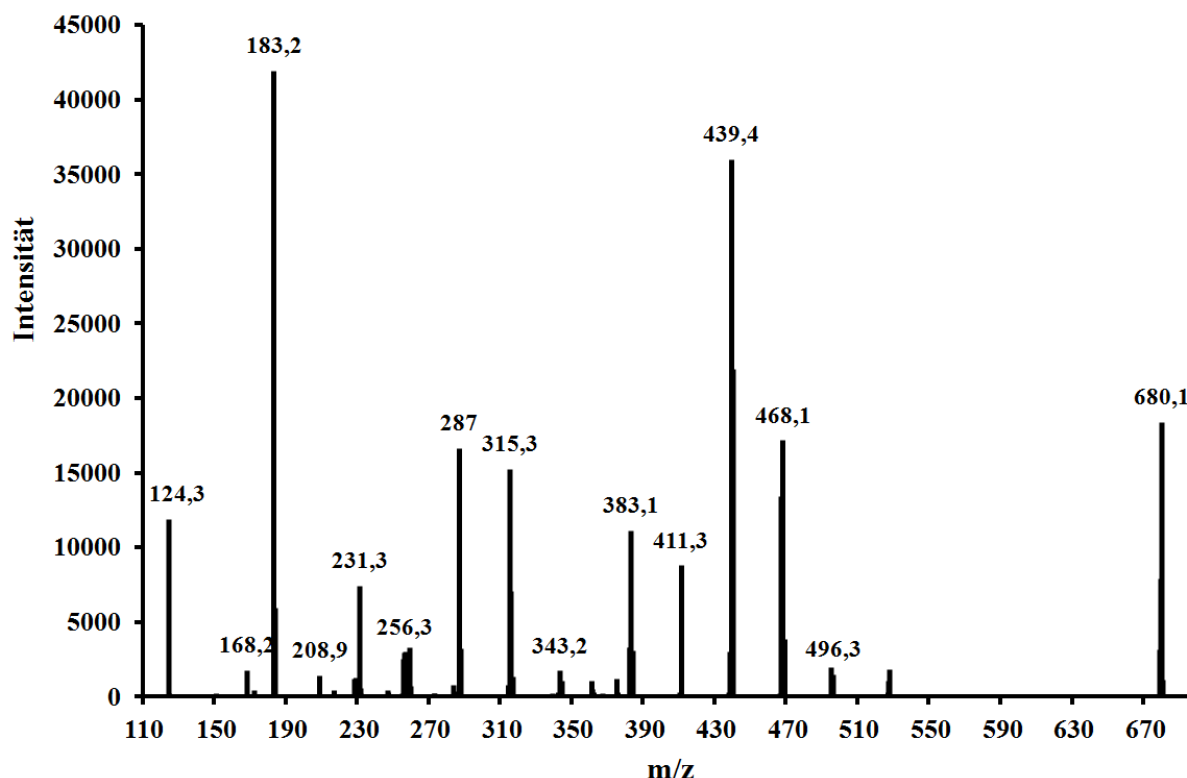


Abb. 126: Massenspektrum des Tochterionen-Scans der Verbindung mit einem Masse/Ladungsverhältnis von 680 aus der Methanolyse

Das Massenspektrum entspricht insgesamt gesehen nicht demjenigen einer klassischen Galloylglukose, bei dem aufgrund der schrittweisen Abspaltung von Galloyleinheiten typischerweise mehrere Differenzen von stets $m/z = 152$ auftreten. Allerdings lassen die beobachteten Fragmente mit $m/z = 124$, 168 und 183 , welche mit hoher Sicherheit als Pyrogallol-, Gallussäure- und Methylgallat-Abgangsgruppen identifizierbar sind, auf eine Verbindung schließen, die grundsätzlich ähnliche Bestandteile aufweist.

Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, tritt diese Spezies lediglich intermediär während der Methanolyse der Gallotanninmischung auf, was dafür spricht, dass

sie erst bei der Reaktion mit Methanol gebildet wird. Diese Erkenntnis legt wiederum nahe, zu untersuchen, ob und wie sich diese Spezies verändert, wenn anstelle des Methanols ein anderer Alkohol eingesetzt wird. In Abb. 127 sind die korrespondierenden Chromatogramme für eine Ethanolyse sowie eine *n*-Propanolyse den Ergebnissen der Methanolyse gegenüber gestellt.

In den entsprechenden Chromatogrammen treten unabhängig vom eingesetzten Alkohol stets an der gleichen Position die Peaks der Gallussäure und der bereits besprochenen Galloylglukosen auf. Darüber hinaus sind jeweils zwei Peaks zu erkennen, deren Position in Abhängigkeit vom verwendeten Alkohol verschoben auftreten. Zum einen wird verständlicherweise statt des Methylgallates der entsprechende Gallussäureester des vorhandenen Alkohols gebildet (Propylgallat bzw. Ethylgallat). Zum anderen verändert sich gleichsam der Peak, welchem im Falle einer Methanolyse ein Masse/Ladungsverhältnis von $m/z = 680$ zuzuordnen ist. Dieser Peak wird einerseits mit zunehmender Kettenlänge des Alkohols zu höheren Retentionszeiten verschoben und das zuzuordnende Masse/Ladungsverhältnis nimmt zu. Die Differenz von $m/z = 28$ zwischen den korrespondierenden Verbindungen aus Methanolyse und Ethanolyse, sowie in gleicherweise zwischen Ethanolyse und *n*-Propanolyse, welche stets zwei Methylenheiten entspricht, suggeriert stark, dass die gebildeten Spezies jeweils an zwei Stellen mit dem eingesetzten Alkohol verestert vorliegen.

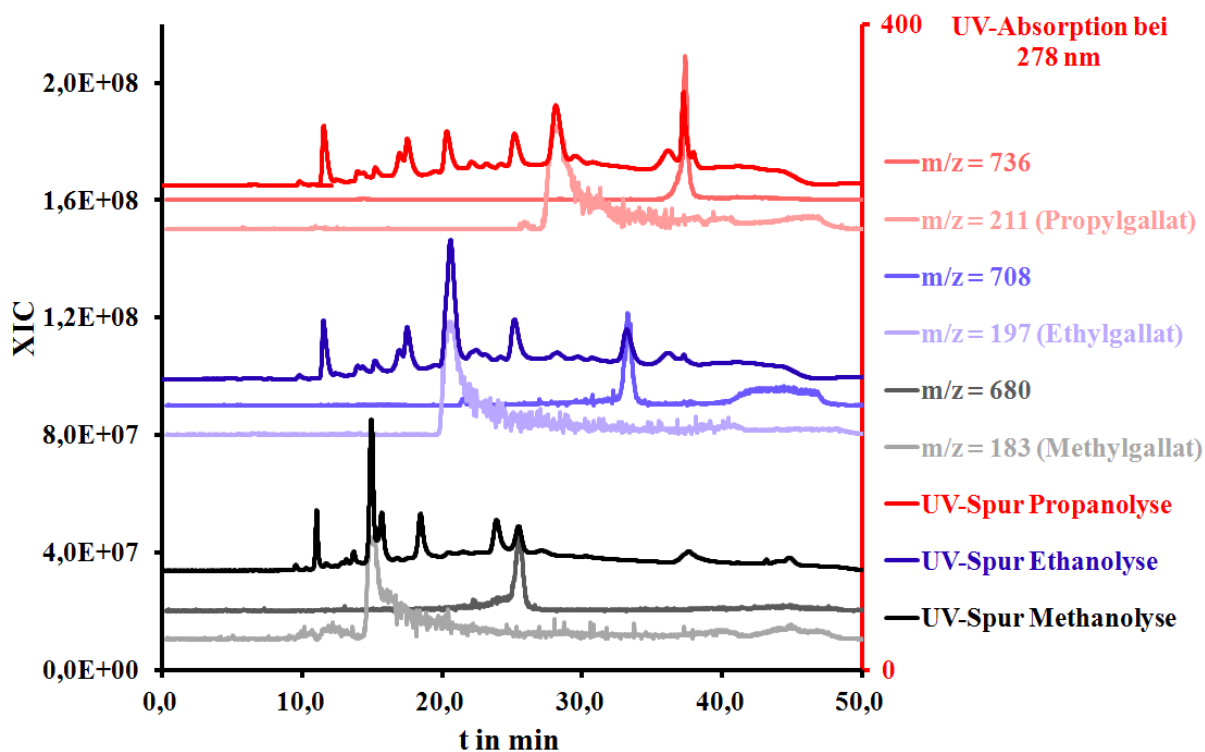


Abb. 127: UV-Spuren und ausgewählte XIC-Chromatogramme der *n*-Propanolyse, Ethanolyse und Methanolyse der Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis*

4.3.2.3 Untersuchungen zu den Aufarbeitungsschritten der Methanolyseprodukte

Zur Aufarbeitung der Produkte der Methanolyse der Gallotanninmischung werden gemäß Abschnitt 3.13.1 mehrere Extraktions- und Kristallisationsschritte durchgeführt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird näher untersucht, welche Komponenten bei den einzelnen Schritten abgetrennt werden.

Nach der vollständigen Methanolyse nach 24 h bei 70 °C wird zunächst die organische Lösemittelkomponente weitgehend an einem Rotationsverdampfer entfernt, um bei der anschließenden Extraktion mit Diethylether eine eindeutige Phasenseparation sicherzustellen. In Abb. 128 sind semi-präparative Chromatogramme der Reaktionsmischung nach erfolgter Methanolyse sowie der beiden getrennten Phasen nach der Diethyletherextraktion abgebildet.

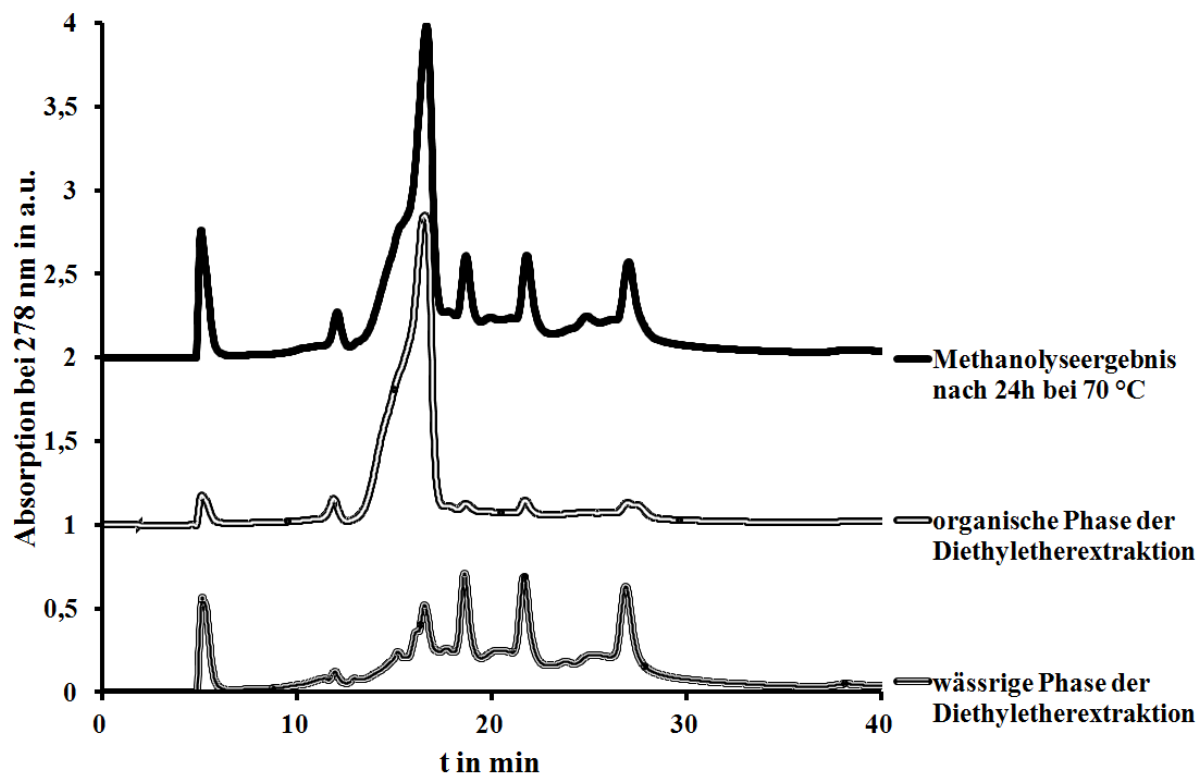


Abb. 128: Semi-präparative HPLC-Chromatogramme der Reaktionsmischung nach 24 h Methanolyse der Gallotanninmischung, sowie der einzelnen Phasen der anschließenden Diethyletherextraktion

Es ist zu erkennen, dass annähernd ausschließlich der Methylgallat-Anteil, welcher anhand des dominanten Peaks bei 16 min zu erkennen ist, bei der Extraktion in die etherische Phase übergeht, während alle anderen Komponenten annähernd quantitativ in der wässrigen Phase verbleiben.

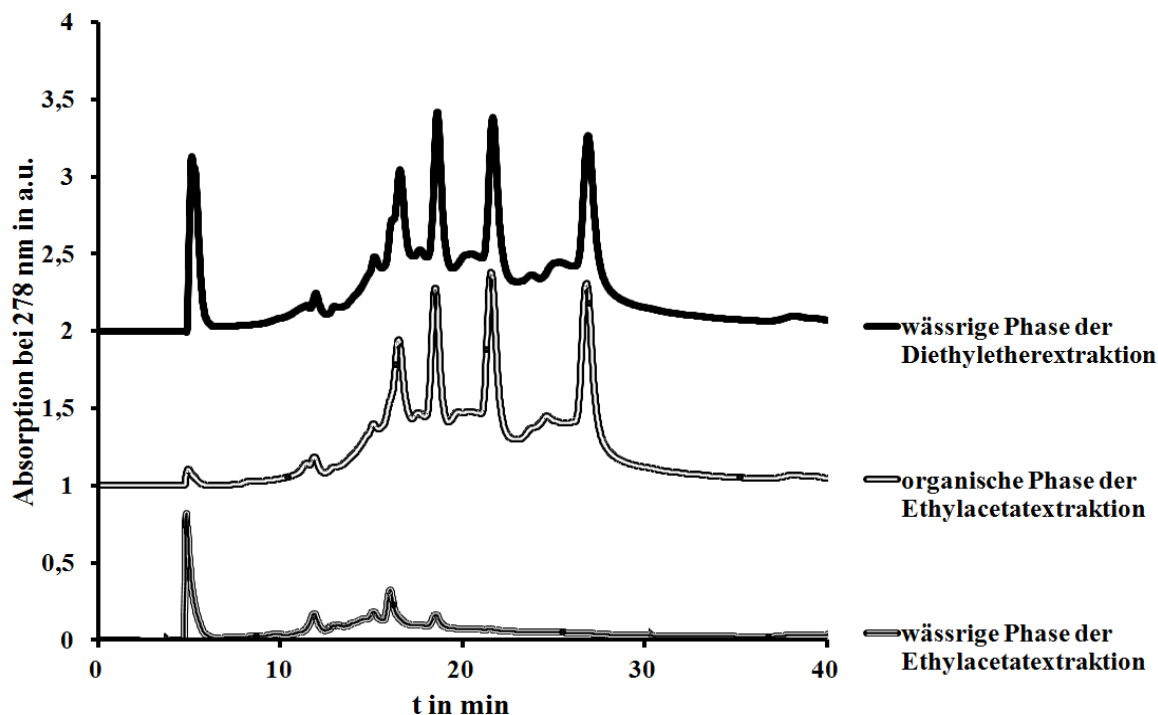


Abb. 129: Semi-präparative Chromatogramme der wässrigen Phase der Diethyletherextraktion, sowie der einzelnen Phasen der daran anschließenden Essigsäureethylester-Extraktion

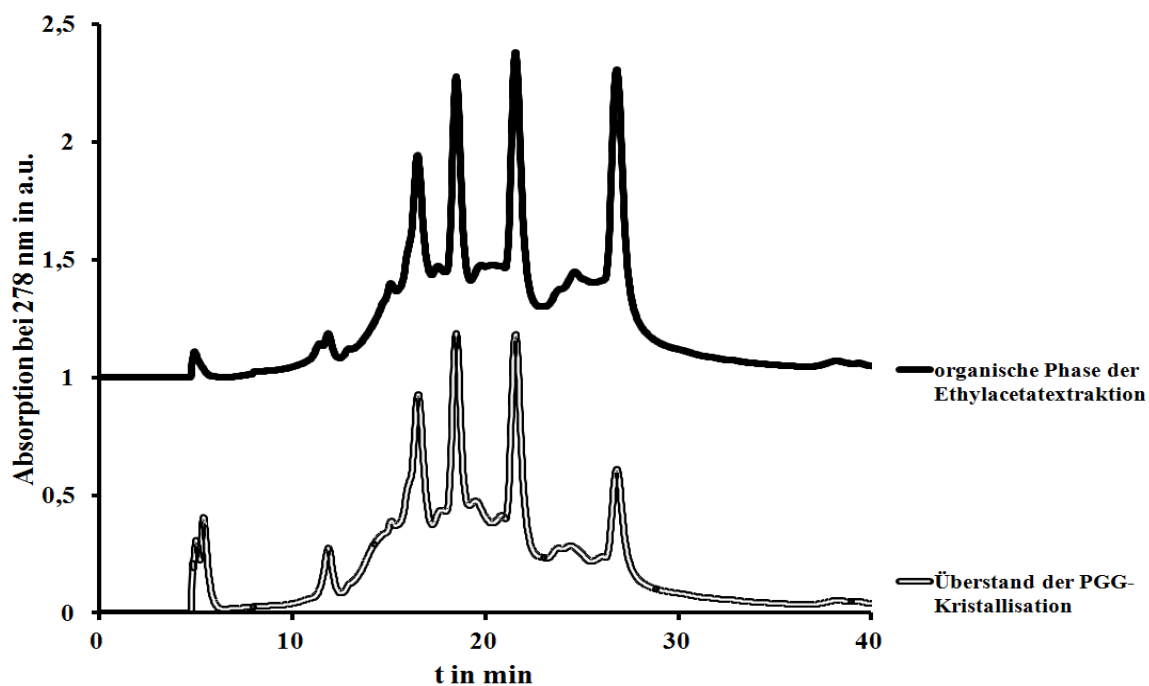


Abb. 130: Überstand vor und nach der Kristallisation von PGG

Die Stoffverteilung in der folgenden Extraktion mit Essigsäureethylester ist in Abb. 129 demonstriert. Bei diesem Schritt wird ausschließlich die Gallussäure, die bei 6 min zu erkennen ist, in der wässrigen Phase zurückgehalten, wohingegen alle übrigen Komponenten nahezu quantitativ in die Esterphase übergehen.

Nach Entfernen des Esters am Rotationsverdampfer und Wiederaufnahme in Reinstwasser ist das System nur noch im erwärmten Zustand phasenstabil. Bei Abkühlung der Lösung auf 4 °C kristallisiert 1,2,3,4,6-O-Pentagalloylglukose (PGG) aus. Abb. 130 zeigt den Überstand vor und nach diesem Kristallisationsschritt. Die deutliche Abnahme des PGG-Peaks bei 27 min im Kristallisationsüberstand ist klar zu erkennen.

4.3.2.4 Gewinnung der finalen Tanninspezies durch semi-präparative HPLC

Um die final erhaltenen Tanninspezies 3GG, 4GG und PGG separat in Reinform isolieren zu können, wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine semi-präparative HPLC an einer RP 8-Säule durchgeführt.

Für die Isolierung der als 3GG und 4GG bezeichneten Galloylglukosen dient in der Regel der im vorhergehenden Abschnitt beschriebene Überstand der PGG-Kristallisation, welcher nach Einengung am Rotationsverdampfer auf die Chromatographiesäule aufgetragen wird. Das resultierende semi-präparative HPLC-Chromatogramm samt der Rechromatogramme der isolierten Verbindungen ist in Abb. 131 gezeigt.

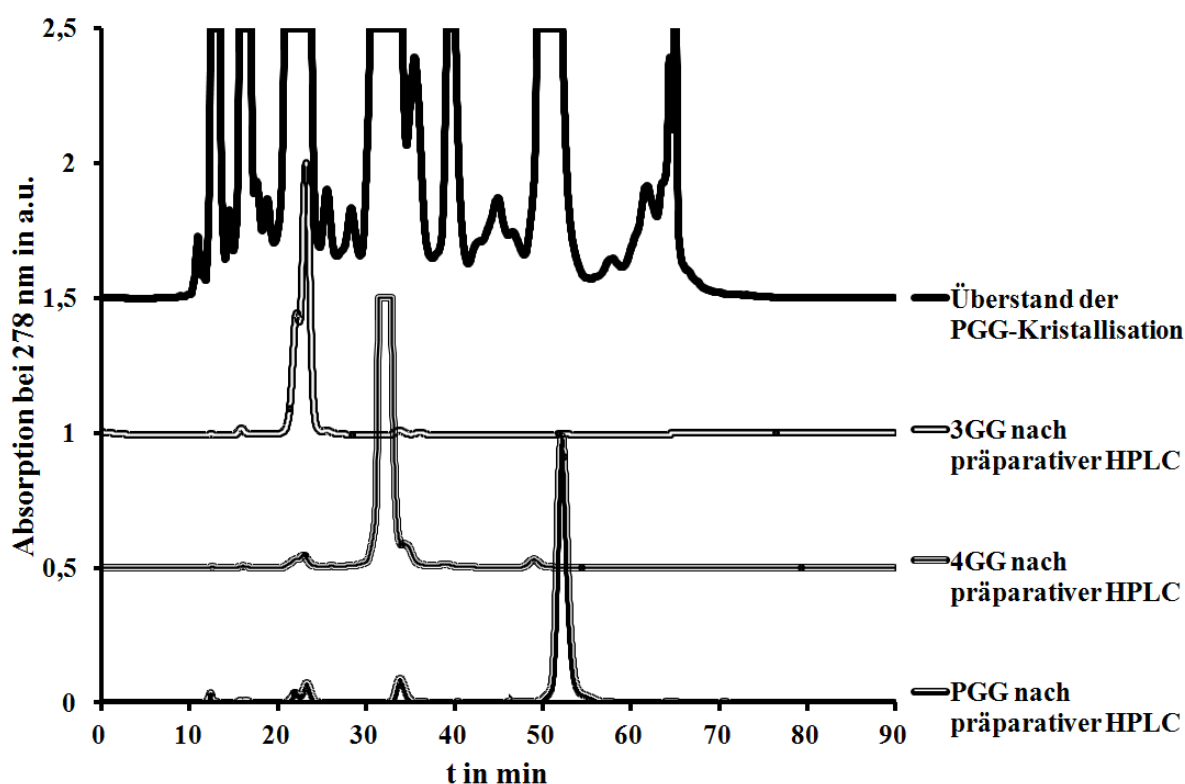


Abb. 131: Semi-präparative HPLC-Chromatogramme und Rechromatogramme der Isolierung der finalen Tanninfraktionen 3GG, 4GG und PGG aus dem Überstand der PGG-Kristallisation

Für jede der isolierten Tanninspezies weist das anschließende Rechromatogramm lediglich einen einzelnen nennenswerten Peak auf, sodass von einer hohen Reinheit der Substanzen ausgegangen werden kann. Weiterhin ist zu erkennen, dass der Retentionsunterschied zwischen PGG und den anderen beiden Spezies sehr groß ist, was dazu führt, dass selbst bei einer erheblichen Peakverbreiterung eine saubere Abtrennung noch gewährleistet werden kann. Daher kann die gleichzeitige Isolierung aller drei Tanninspezies ebenso ohne Durchführung der PGG-Kristallisation erfolgreich realisiert werden, wie in Abschnitt 3.13 beschrieben.

Die Gewinnung von reiner PGG durch Umkristallisation und anschließende semi-präparative HPLC ist in Abb. 132 dargestellt. Auch in diesem Fall wird eine reine Zielsubstanz erhalten. Es ist allerdings auch zu erkennen, dass bei der Kristallisation und Umkristallisation Verunreinigungen erhalten bleiben, was darauf zurückzuführen ist, dass der ausfallende Niederschlag sehr voluminös auftritt und daher große Mengen der Mutterlauge selbst nach Zentrifugation noch enthalten sind. Waschschrte mit kaltem Wasser führen zu keiner ausreichenden Verbesserung des Trenneffektes.

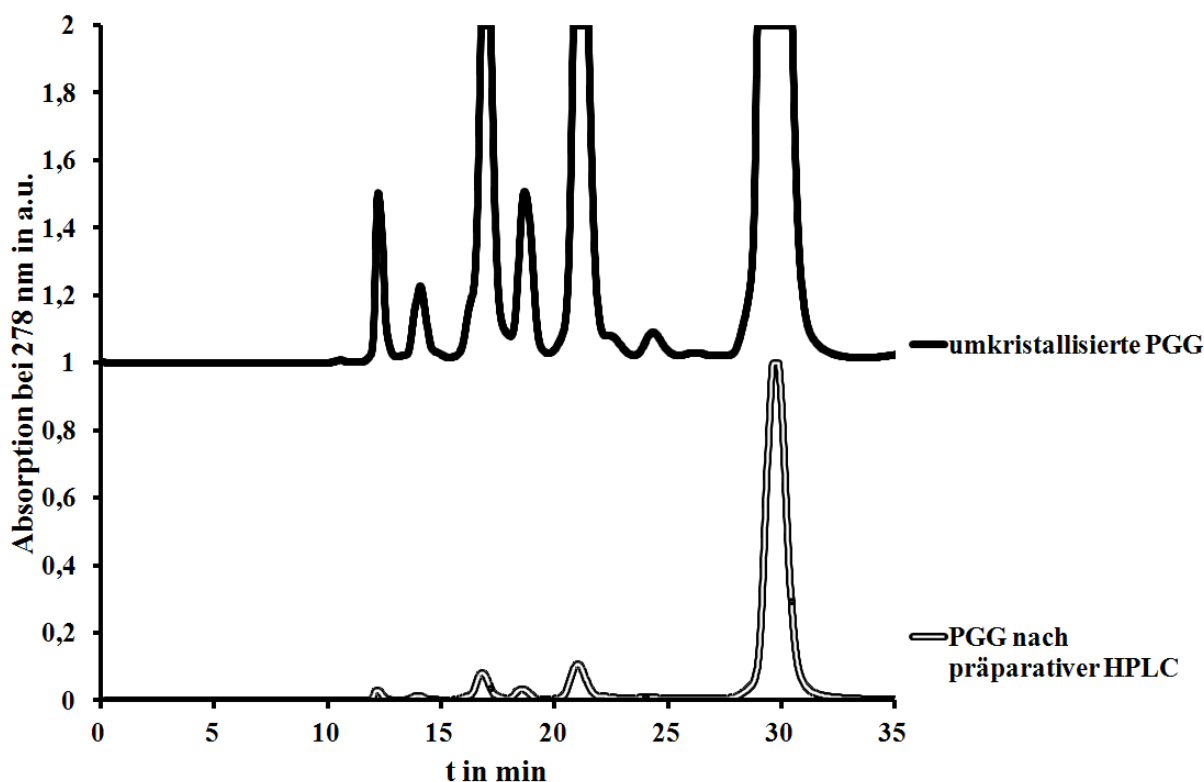


Abb. 132: Semi-präparative HPLC-Chromatogramme und Rechromatogramme der Isolierung von PGG durch Umkristallisieren und semi-präparative HPLC

4.3.2.5 NMR-spektroskopische Strukturaufklärung der finalen Tanninspezies

Mithilfe der im vorhergehenden Abschnitt erläuterten Isolationsverfahren für die finalen Tanninspezies 3GG, 4GG und PGG lassen sich ausreichende Mengen in reiner Form darstellen, um mehrdimensionale NMR-Spektren der Verbindungen in DMSO- d_6 aufnehmen zu können. Im Gegensatz zu den NMR-Untersuchungen an Peptiden, wie sie in den Abschnitten 4.1.4 und 4.2.5 behandelt werden, kann hierbei für die Signalzuordnung nicht von einer bekannten Strukturformel ausgegangen werden. Das vorgenommene Assignment und die daraus ermittelten Strukturcharakteristika der einzelnen Tanninspezies verdienen daher an dieser Stelle eine größere Aufmerksamkeit und werden exemplarisch anhand der Trigalloylglukose 3GG besprochen.

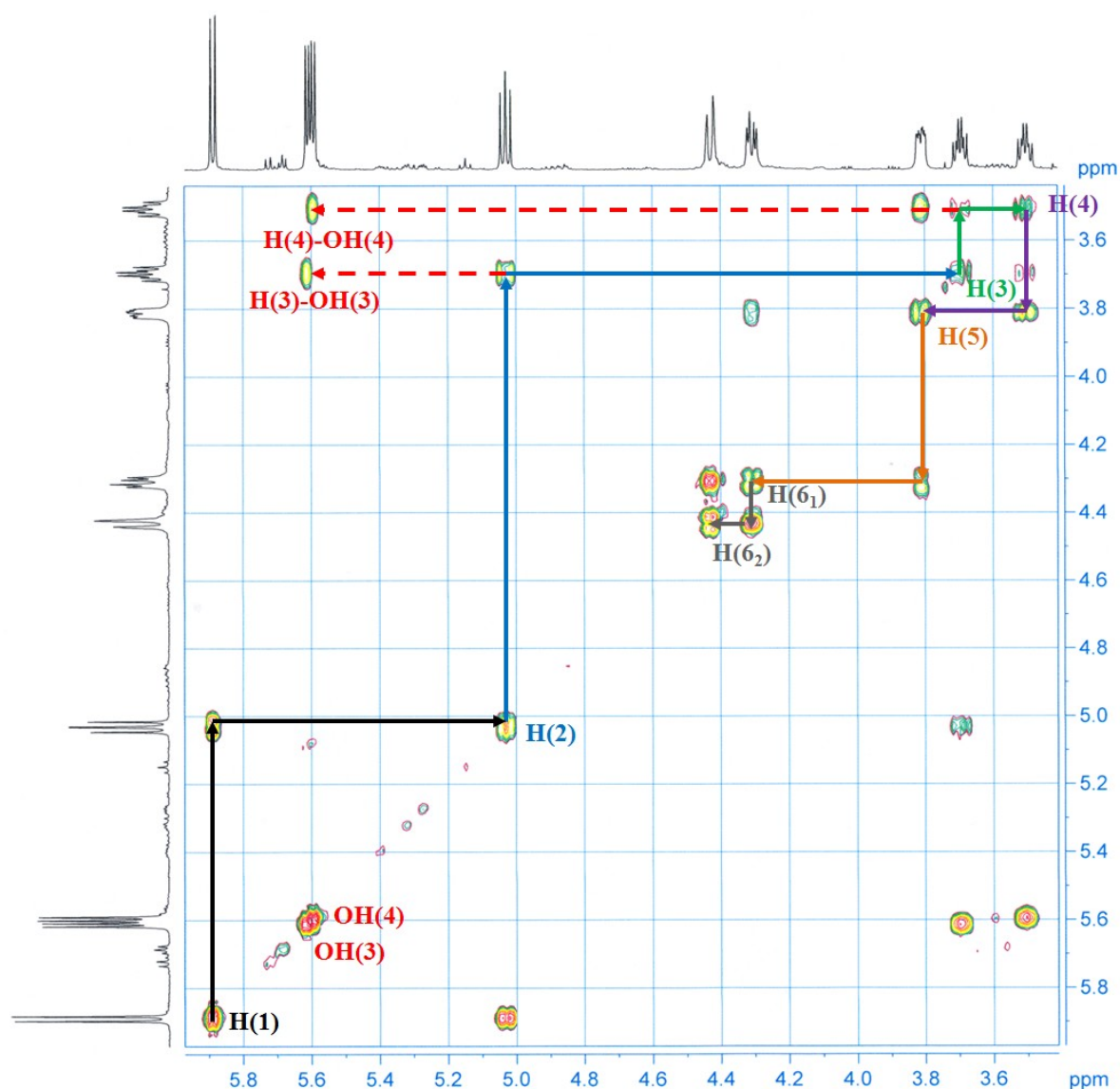


Abb. 133: $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY der Trigalloylglukose 3GG in DMSO- d_6 im Bereich der Glukose-Signale; skalare Kopplungen entlang des Glukoserings durch Pfeile gekennzeichnet

Unter Berücksichtigung der LC-MS/MS-Ergebnisse aus Abschnitt 4.3.2.1 kann ohne weiteres davon ausgegangen werden, dass 3GG eine dreifach mit Galloyleinheiten veresterte Glukose darstellt, wobei lediglich anhand der HPLC-Peakform angenommen wird, dass es sich um ein einzelnes Isomer handelt. Eine Untersuchung der Veresterungspositionen an der Glukose ist daher von besonderem Interesse. Abb. 133 illustriert die beobachtbaren skalaren Kopplungen innerhalb des Glukoserings von 3GG anhand des $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY in DMSO- d_6 . Alle Kontakte zwischen den jeweils benachbarten aliphatischen Protonen sind klar erkenntlich, was ein Abschreiten des Ringes beginnend bei dem sehr stark entschirmten Proton an C1 bis zu den beiden nicht-äquivalenten ^1H -Kernen an C6 ermöglicht. Zusätzliche J-Kopplungen zu entsprechenden OH-Gruppen treten nur an C3 und C4 auf, sodass eindeutig erkennbar ist, dass es sich bei 3GG um 1,2,6-O-Trigalloylglukose handelt.

Tabelle 31 enthält eine Zusammenstellung der gemessenen chemischen Verschiebungen, Peakintensitäten, sowie der auftretenden Multipllettstrukturen samt Kopplungskonstanten für die ^1H -Kerne der zentralen Glukoseeinheit.

Tabelle 31: Übersicht der ^1H -NMR-Ergebnisse für die Glukoseeinheit von 3GG

zugeordneter ^1H -Kern	δ in ppm	Peakintensität	Multipllett*	Kopplungskonstanten
H(1)	5,89	1,00	d	$^3J(\text{H}(1)-\text{H}(2)) = 8,5 \text{ Hz}$
H(2)	5,03	1,06	dd	$^3J(\text{H}(1)-\text{H}(2)) = 8,6 \text{ Hz}$ $^3J(\text{H}(2)-\text{H}(3)) = 9,4 \text{ Hz}$
H(3)	3,69	1,13	td	$^3J(\text{H}(2)-\text{H}(3)) = 9,2 \text{ Hz}$ $^3J(\text{H}(3)-\text{H}(4)) = 9,2 \text{ Hz}$ $^3J(\text{H}(3)-\text{OH}(3)) = 5,6 \text{ Hz}$
OH(3)	5,61	2,20 (mit OH(4))	d	$^3J(\text{H}(3)-\text{OH}(3)) = 5,6 \text{ Hz}$
H(4)	3,50	1,07	td	$^3J(\text{H}(3)-\text{H}(4)) = 9,2 \text{ Hz}$ $^3J(\text{H}(4)-\text{H}(5)) = 9,2 \text{ Hz}$ $^3J(\text{H}(4)-\text{OH}(4)) = 5,8 \text{ Hz}$
OH(4)	5,60	2,20 (mit OH(3))	d	$^3J(\text{H}(4)-\text{OH}(4)) = 5,8 \text{ Hz}$
H(5)	3,81	1,17	ddd	$^3J(\text{H}(4)-\text{H}(5)) = 9,7 \text{ Hz}$ $^3J(\text{H}(5)-\text{H}(6_1)) = 4,5 \text{ Hz}$ $^3J(\text{H}(5)-\text{H}(6_2)) = 1,8 \text{ Hz}$
H(6 ₁)	4,31	1,32	dd	$^3J(\text{H}(5)-\text{H}(6_1)) = 4,6 \text{ Hz}$ $^2J(\text{H}(6_1)-\text{H}(6_2)) = 12,1 \text{ Hz}$
H(6 ₂)	4,43	1,29	dd	$^3J(\text{H}(5)-\text{H}(6_2)) = 1,7 \text{ Hz}$ $^2J(\text{H}(6_1)-\text{H}(6_2)) = 12,1 \text{ Hz}$

* **Multipllettnotation (d: Dublett; dd: Dublett eines Dubletts; ddd: Dublett eines Dubletts eines Dubletts; td: Tripllett eines Dubletts)**

Die aufgelisteten vicinalen bzw. im Falle der beiden Protonen an C6 geminalen Kopplungskonstanten bestätigen die vorgenommene Zuordnung. Die signifikant voneinander abweichenden Kopplungskonstanten zwischen den beiden Protonen an C6 zu dem Proton an C5 sind auf die unterschiedlichen Diederwinkel zwischen den jeweils koppelnden Protonen

zurückzuführen. Dieses Phänomen erlaubt auch eine Aussage zum vorliegenden Anomer der Glukose. Die ermittelte vicinale Kopplungskonstante zwischen H(1) und H(2) von 8,5 Hz ist gemäß Karplus- oder Bothner-By-Gleichung nicht mit einem Diederwinkel von 60° , wie er im α -Anomer zu finden ist, vereinbar, sondern verweist eindeutig auf die 180° -Anordnung des β -Anomers (vgl. Abschnitt 1.3.3).

Die Zuordnung der ^{13}C -Signale erfolgt auf Basis des erläuterten ^1H -Assignments mithilfe eines $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrums der Verbindung in DMSO-d_6 , welches in Abb. 134 zu sehen ist. In dem Spektrum sind bei ^1H -Verschiebungen von 6,88 ppm, 6,92 ppm und 6,97 ppm sowie einer annähernd einheitlichen ^{13}C -Verschiebung von 109,0 ppm auch die aromatischen CH-Signale der Galloyleinheiten zu erkennen. Da in jedem der vorhandenen Gallussäureeinheiten die Protonen in der jeweiligen Position c1 und c2 äquivalent zueinander sind, wird für jede Galloyleinheiten ein Singulett im ^1H -NMR-Spektrum beobachtet, was in diesem Fall zu drei dicht benachbarten Peaks führt.

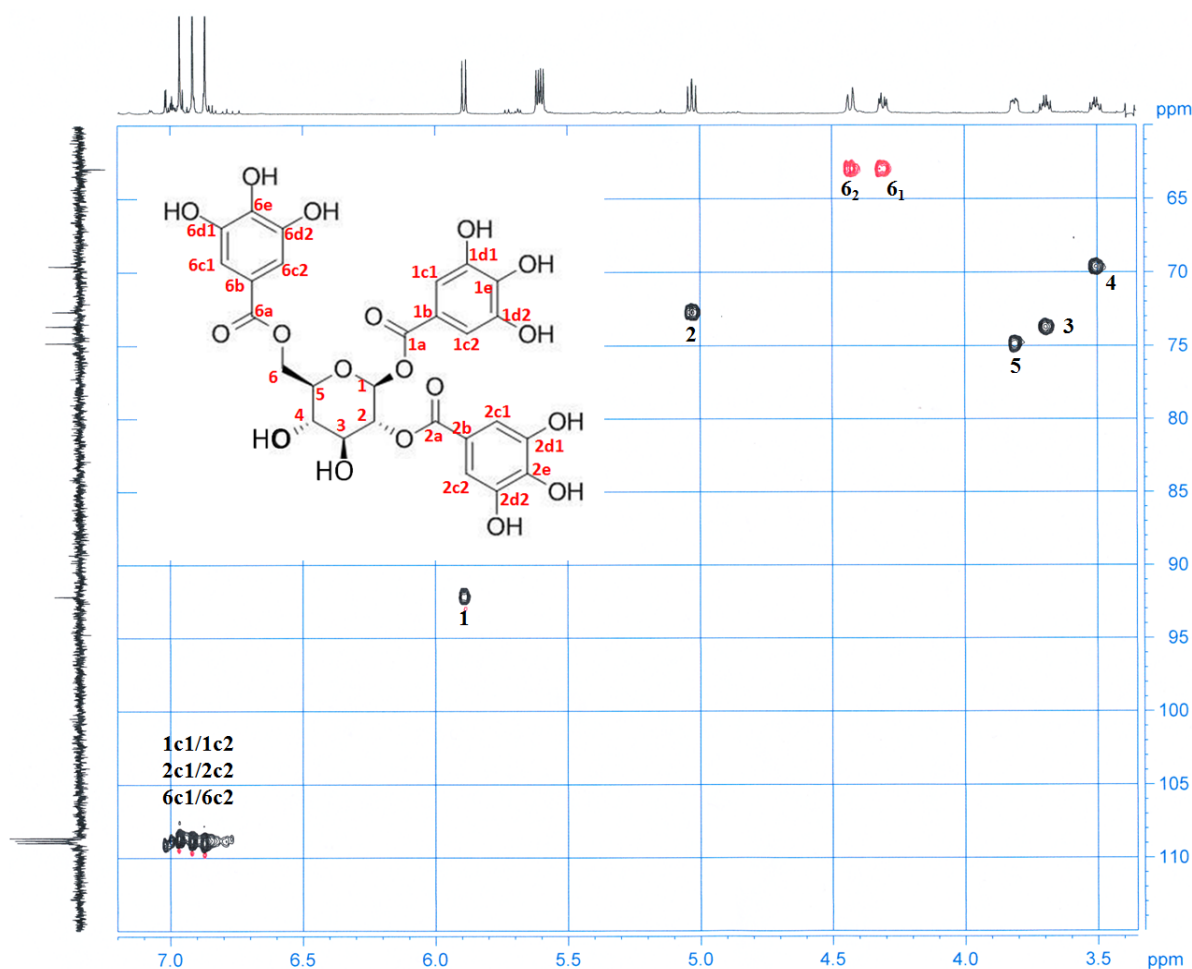


Abb. 134: $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum von 3GG in DMSO-d_6 samt Signalzuordnung

4 Ergebnisse

Betrachtet man hingegen den korrespondierenden Bereich der ^1H -NMR-Spektren der Tetragalloylglukose 4GG bzw. der Pentagalloylglukose PGG, so treten zwischen 6,7 ppm und 7,0 ppm 4 bzw. 5 solcher Singulets auf, wie anhand der vergleichenden Gegenüberstellung in Abb. 135 deutlich wird. Insoweit ist es evident, dass jede Galloyleinheit zu einem charakteristischen Signal für die besprochenen Protonen führt. Die Zuordnung dieser Signale zu den einzelnen Galloyleinheiten ist indes nicht ohne weiteres zu bewerkstelligen und wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt.

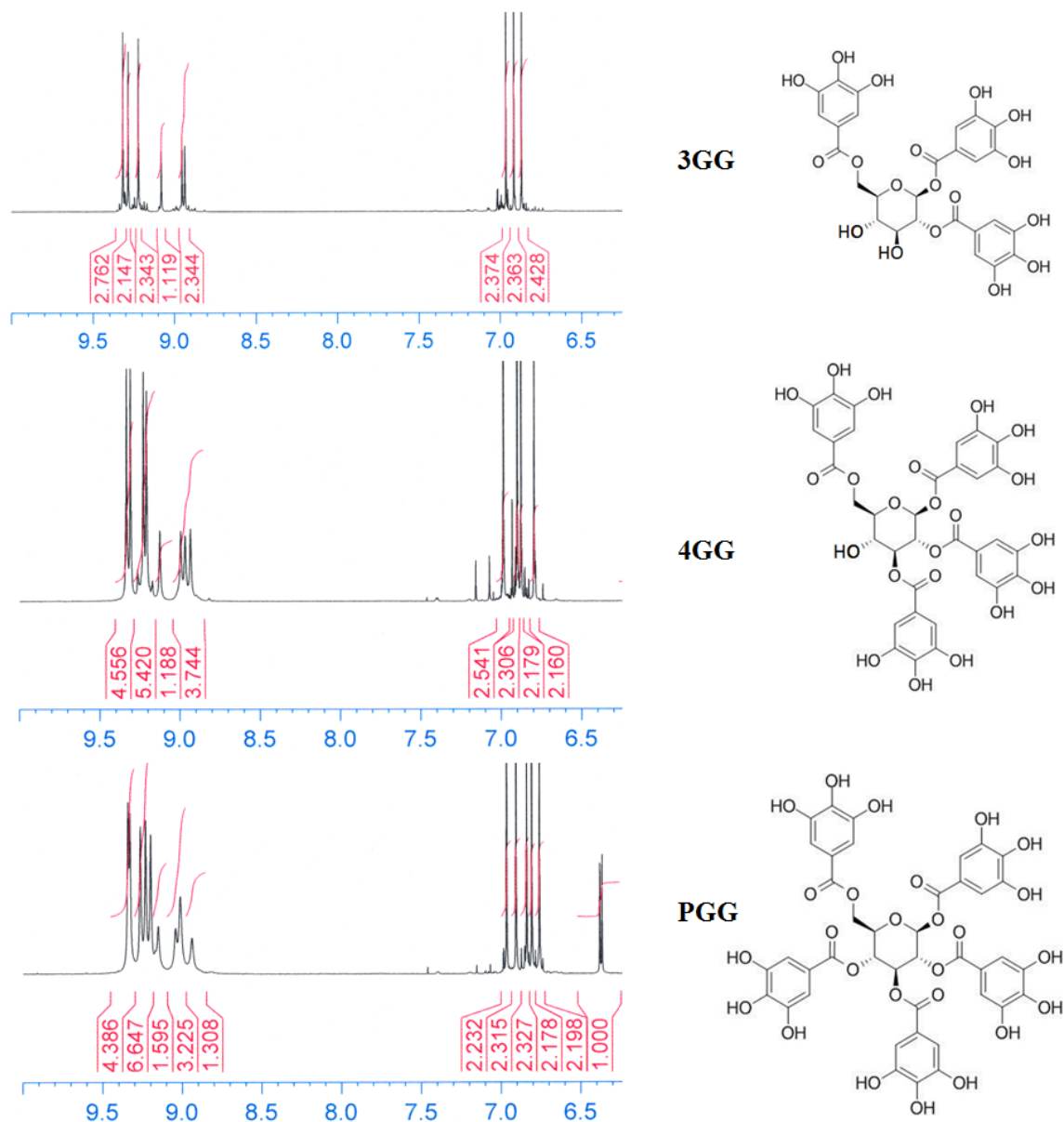


Abb. 135: ^1H -NMR-Spektren der Tanninspezies 3GG, 4GG und PGG im Bereich der aromatischen und phenolischen Signale mit der korrespondierenden Strukturformel der Verbindung

In Abb. 135 sind desweiteren oberhalb einer chemischen Verschiebung von 8,7 ppm die Signale der phenolischen OH-Gruppen für die isolierten Tanninspezies zu sehen. Insbesondere in den Spektren der Trigalloylglukose 3GG und der Tetragalloylglukose 4GG ist ersichtlich, dass im erstgenannten Fall 3 bzw. im letztgenannten Fall 4 Singulett mit einer relativen Intensität von je ca. 1 unterhalb einer chemischen Verschiebung von 9,2 ppm auftreten, die oberhalb dieser Verschiebung von 3 bzw. 4 weiteren Singulett mit etwa doppelt so hoher Intensität gefolgt werden. Es ist daher offensichtlich, dass die Signale unterhalb von 9,2 ppm die einzelnen *para*-ständigen OH-Gruppen der Galloyleinheiten repräsentieren, während die Signale oberhalb dieser Verschiebung den beiden jeweils zueinander äquivalenten Protonen in *meta*-Position zur Säuregruppe zuzuordnen sind.

Die Zuordnung der ^1H -Signale von 4GG und PGG erfolgt analog zu dem exemplarisch für 3GG dargestellten Vorgehen. Dabei wird für 4GG nur die Glukose-OH-Gruppe an C4 detektiert, womit sich diese Verbindung zweifelsfrei als 1,2,3,6-O-Tetragalloyl- β -D-Glukose identifizieren lässt. Für PGG wird erwartungsgemäß keine OH-Gruppe an der Glukoseeinheit registriert, womit die bereits vermutete Identifikation als 1,2,3,4,6-O-Pentagalloyl- β -D-Glukose bestätigt werden kann. Eine Zusammenstellung der ^1H -NMR-Ergebnisse für 4GG und PGG entsprechend Tabelle 31 ist dem Anhang in Abschnitt 10.4 beigelegt.

Die Zuordnung der ^{13}C -Verschiebungen der drei Tanninspezies ist in Tabelle 32 vergleichend gegenüber gestellt.

Tabelle 32: Übersicht der ^{13}C -Verschiebungen von 3GG, 4GG und PGG

zugeordneter ^{13}C -Kern	^{13}C -Verschiebungen in ppm		
	3GG	4GG	PGG
C1	92,0	92,0	92,0
C2	72,5	70,5	70,5
C3	74,0	74,5	72,0
C4	69,5	67,5	67,5
C5	75,0	75,0	72,0
C6	63,0	62,5	61,5
<i>ortho</i> -ständige aromatische ^{13}C -Kerne	109	109	109

4.3.2.6 Weiterführende Charakterisierung der finalen Tanninspezies

Die Isolierung der Tanninspezies 3GG, 4GG und PGG in reiner Form ermöglicht neben der zuvor dargestellten NMR-spektroskopischen Strukturaufklärung weitere analytische Charakterisierungen jener Verbindungen. Eine Analyse der Verbindungen mittels analytischer

4 Ergebnisse

HPLC an einer RP 18-Säule ist bereits im Rahmen der Darstellung der LC-MS/MS-Untersuchungen in Abschnitt 4.3.2.1 angesprochen worden, wobei auch die Bestimmung des Galloylierungsgrades aufgrund der Molekülmassen-Masse erklärt wird. Die Verfügbarkeit der lyophilisierten Reinstoffe erlaubt darüber hinaus die Erstellung einer Kalibrierreihe, um den Gehalt der einzelnen Spezies in Lösungen genau quantifizieren zu können (siehe Abschnitt 3.15.2).

In Abb. 136 sind ausgewählte HPLC-Chromatogramme dieser Reihe sowie die ermittelte Kalibriergerade für die Trigalloylglukose 3GG abgebildet. Der konzentrationsabhängige Peak von 3GG erscheint bei einer Retentionszeit von 16,5 min.

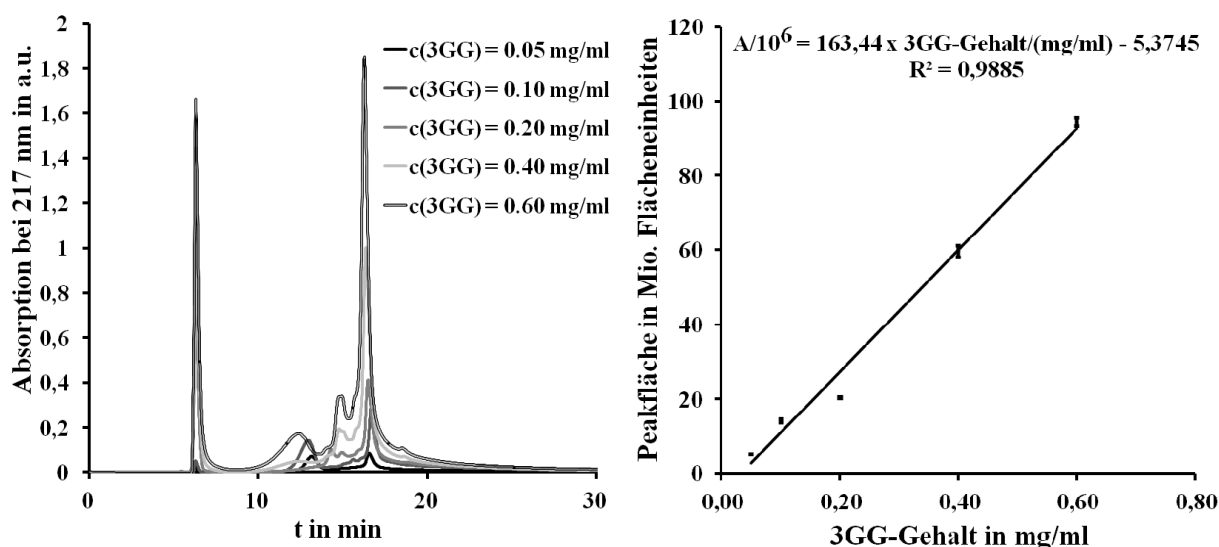


Abb. 136: Analytische HPLC-Chromatogramme ausgewählter Standards (links) und Kalibriergerade (rechts) für die Trigalloylglukose (3GG)

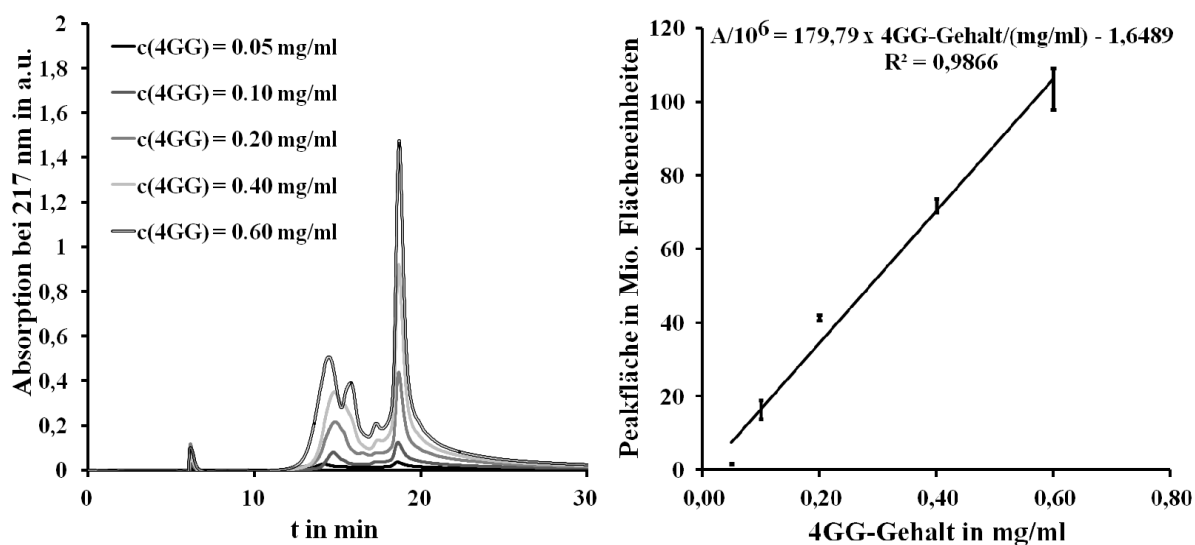


Abb. 137: Analytische HPLC-Chromatogramme ausgewählter Standards (links) und Kalibriergerade (rechts) für die Tetragalloylglukose (4GG)

Die korrespondierenden HPLC-Chromatogramme und die resultierende Kalibriergerade für die Tetragalloylglukose 4GG sind Abb. 137 zu entnehmen. Neben dem Peak der Substanz bei 19,5 min treten Peaks von Verunreinigungen bei niedrigeren Retentionszeiten, unter anderem auch bei 16,5 min, auf. Infolge des Fehlens solcher Peaks in den semi-präparativen Chromatogrammen der Isolierung von 4GG könnten Hydrolyseerscheinungen eine Rolle bei der Entstehung dieser Peaks spielen.

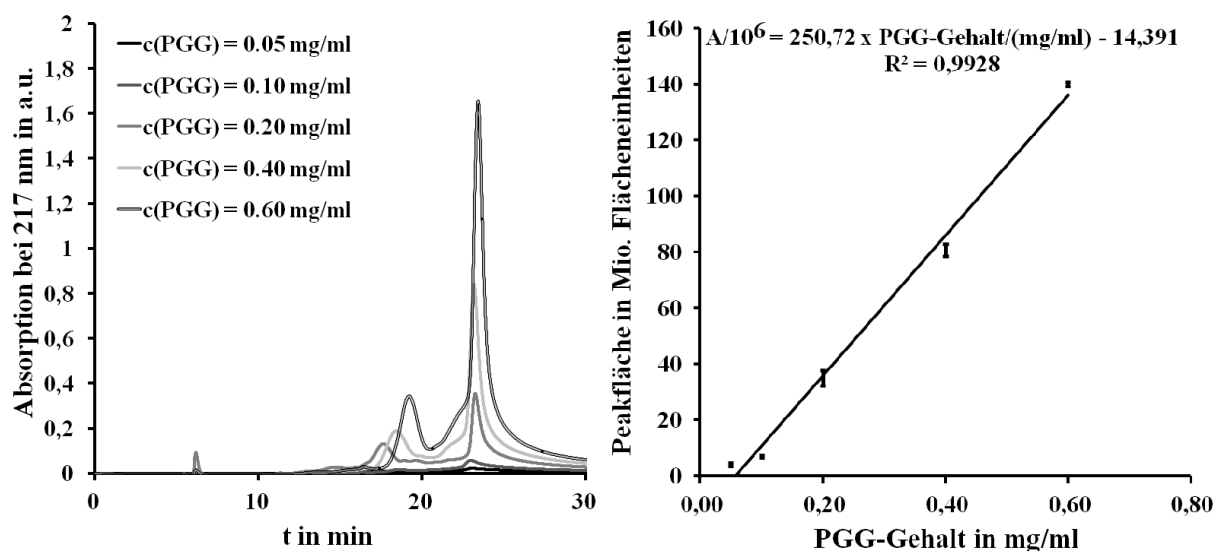


Abb. 138: Analytische HPLC-Chromatogramme ausgewählter Standards (links) und Kalibriergerade (rechts) für 1,2,3,4,6-Pentagalloylglukose (PGG)

Für 1,2,3,4,6-O-Pentagalloyl- β -D-Glukose sind die HPLC-Chromatogramme und die Kalibriergerade in Abb. 138 aufgetragen. In diesem Fall werden nur geringfügige Verunreinigungen beobachtet. Bei einem Vergleich der drei ermittelten Kalibriergeraden fällt auf, dass der jeweilige Anstieg systematisch mit dem Galloylierungsgrad steigt, was aufgrund der gleichsam zunehmenden Anzahl gleichartiger Chromophore auch zu erwarten ist. Einschränkend muss bei dieser Einschätzung aber darauf hingewiesen werden, dass aufgrund des flachen Gradienten der Laufmittelzusammensetzung im Elutionsbereich keine vollständig vergleichbaren Bedingungen gegeben sind.

Infrarotspektroskopisch ähneln sich die drei betrachteten Tanninspezies erheblich, wie anhand der ATR-FTIR-Spektren in Abb. 139 ersichtlich ist. Besonders charakteristisch sind die C-O-Banden die OH-Deformationsbanden des Glukosesystems bei etwa 1000 cm^{-1} und die Phenolbanden der Gallussäureeinheiten bei ca. 1190 cm^{-1} und 1310 cm^{-1} . Da sich die betrachteten Tanninspezies in der Anzahl der Gallussäureeinheiten, die durch Esterbindungen mit dem zentralen Glukosering kovalent verknüpft sind, unterscheiden, ist anzunehmen, dass

das Intensitätsverhältnis der Phenolbanden zu den C-O-Banden des Zuckers in einem systematischen Bezug zur vorliegenden Tanninspezies steht.

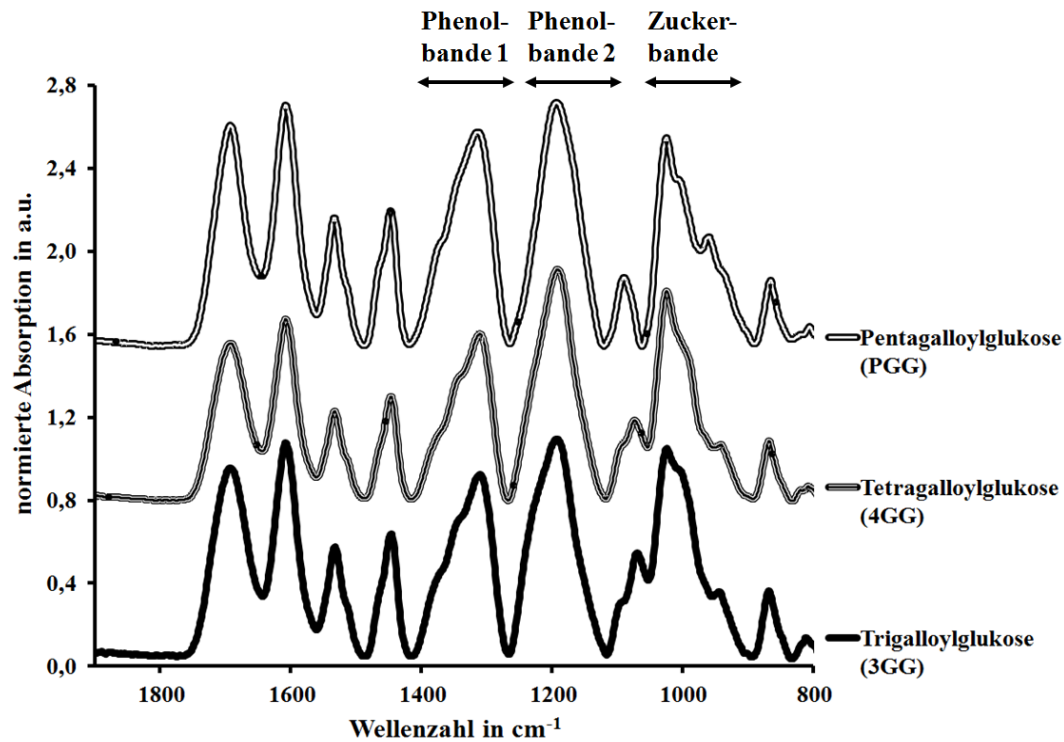


Abb. 139: ATR-FTIR-Spektren der drei finalen Tanninspezies 3GG, 4GG und PGG (Spektren sind basislinien-korrigiert und normiert)

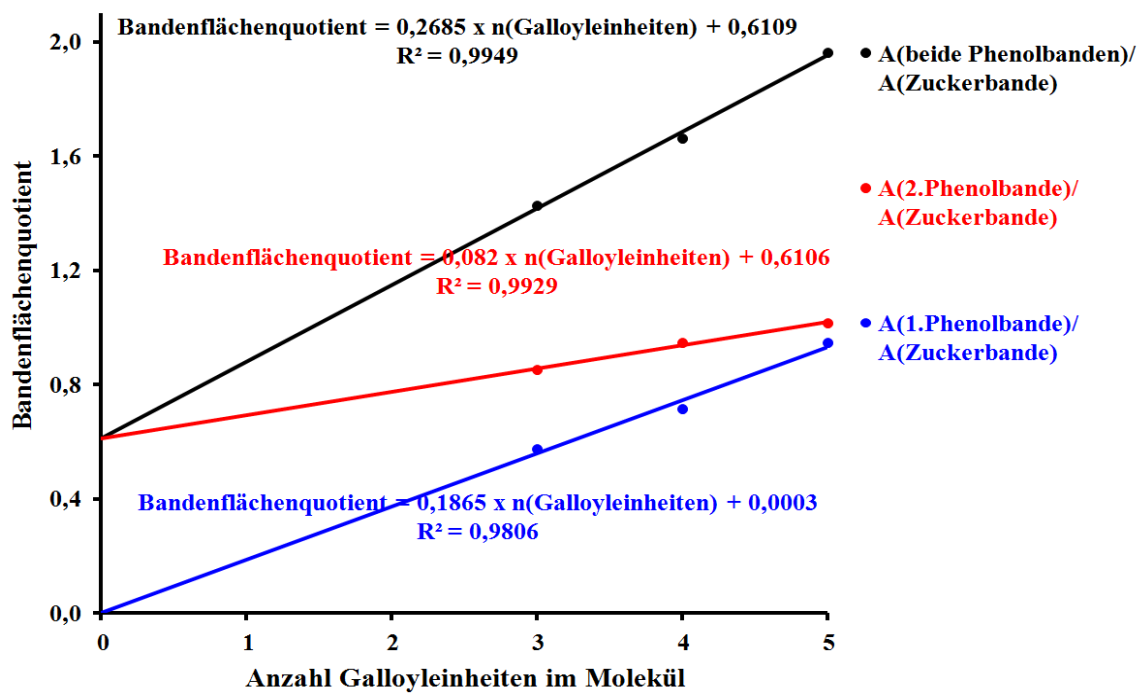


Abb. 140: Auftragung verschiedener Bandenflächenquotienten gegen die Anzahl der in der jeweiligen Tanninspezies enthaltenen Galloyleinheiten

Abb. 140 veranschaulicht die dafür ermittelten Bandenverhältnisse in Abhängigkeit vom Galloylierungsgrad der Verbindungen. Unabhängig davon, ob lediglich eine der beiden Phenolbanden oder deren Summe für die Quotientenbildung herangezogen wird, resultiert erwartungsgemäß ein linearer Zusammenhang zur Anzahl der in der Verbindung vorhandenen Galloyleinheiten. Gleichzeitig verläuft jedoch nur diejenige Kalibriergerade annähernd durch den Koordinatenursprung, welche ausschließlich die Phenolbande 1 bei 1310 cm^{-1} nutzt. Sobald die zweite Phenolbande für die Berechnung hinzugenommen wird, schneidet die Regressionsgerade die Ordinate bei einem Bandenquotienten, der größer als 0,6 ist, was darauf hindeutet, dass an derselben Position noch eine weitere konstante Bande auftritt, die nicht von den Galloyleinheiten abhängig und daher mit hoher Wahrscheinlichkeit dem zentralen Glukosesystem entstammt.

Eine interessante Beobachtung betrifft die Löslichkeit der drei Tanninspezies in wässrigen Systemen. Im Gegensatz zu der ungetrennten Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis*, den daraus mittels Chromatographie gewonnenen Tanninfraktionen TaF1 - TaF4 samt deren Teilfraktionen, sowie der ungetrennten Mischung der Methanolyseprodukte wird im Falle der isolierten Reinverbindungen 3GG, 4GG und PGG eine Fällung in Reinstwasser bei Raumtemperatur beobachtet, wie sie in Abb. 141 fotografisch dokumentiert ist. Die Fällung tritt dabei unterschiedlich stark verzögert ein. Während PGG bereits nach wenigen Minuten einen Niederschlag bildet, wird dieser Prozess für 3GG und 4GG erst nach einigen Tagen beobachtet. Die Fällungsprodukte lassen sich sowohl durch Erwärmen als auch durch Methanolzugabe wieder in Lösung bringen.

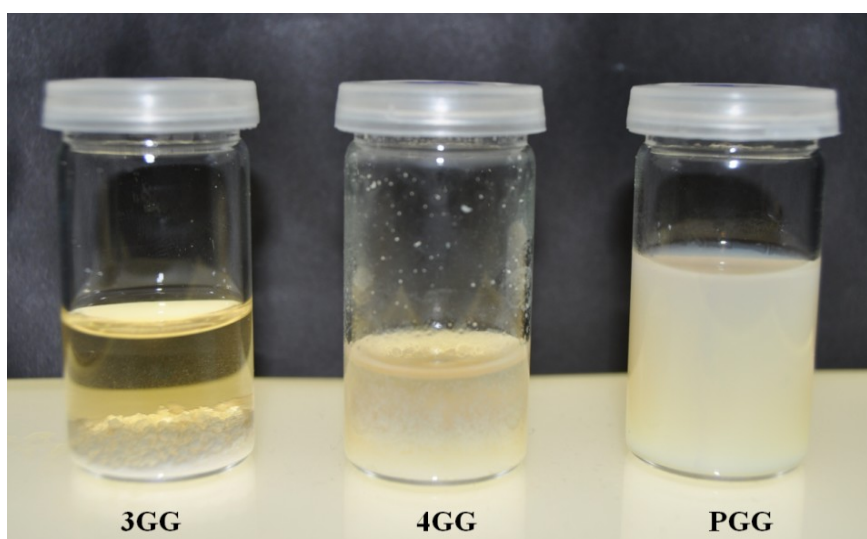


Abb. 141: Präzipitation von 3GG, 4GG und PGG in Reinstwasser nach 48 h Inkubation bei Raumtemperatur

4.3.2.7 Phasenverhalten von 1,2,3,4,6-O-Pentagalloylglukose (PGG) in Gegenwart von Gallussäure und Methylgallat

Wie bereits in Abschnitt 4.3.2.3 erläutert, fällt 1,2,3,4,6-O-Pentagalloylglukose (PGG) aus einer wässrigen Lösung der Methanolyseprodukte aus, wenn durch Extraktion Methylgallat und Gallussäure aus dieser Mischung entfernt werden. Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob dieser Prozess reversibel ist und dementsprechend PGG durch erneute Zugabe einer der beiden Substanzen wieder in Lösung gebracht werden kann.

Um dieses Phänomen systematisch untersuchen zu können, wird eine stets identische Menge an PGG in der Wärme mit unterschiedlichen Mengen an Gallussäure versetzt und die entstehenden Mischungen anschließend schrittweise abgekühlt. Abb. 142 zeigt fotografische Aufnahmen solcher Lösungen in Abhängigkeit von der Temperatur und dem Verhältnis zwischen PGG und Gallussäure. Oberhalb von 37,5 °C ist selbst die Gallussäure-freie PGG-Referenz vollständig gelöst, wohingegen sie unterhalb dieser Temperatur anhand einer Trübung als gefällt erkannt werden kann. In Gegenwart der fünffachen Masse an Gallussäure wird selbst bei der niedrigsten Temperatur von 30 °C noch keine Fällung der PGG registriert. Innerhalb der anderen Proben nimmt die Trübung mit abnehmendem Gehalt an Gallussäure und sinkender Temperatur zu, wodurch ein systematischer Zusammenhang evident ist.

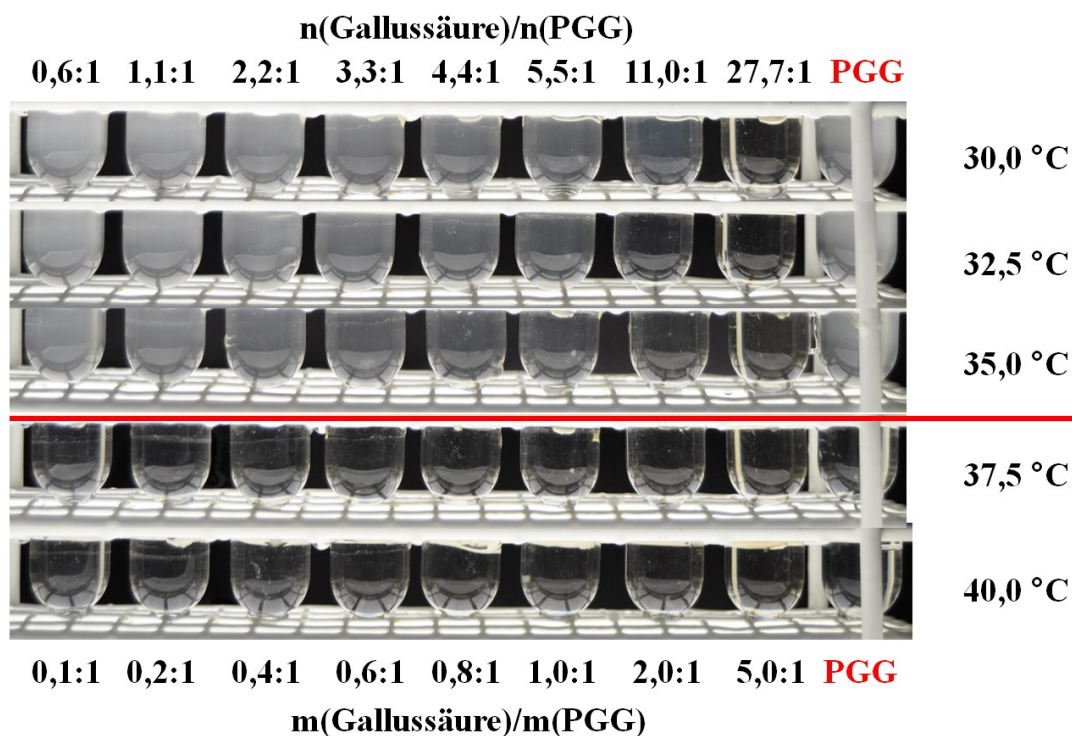


Abb. 142: Erstarrung von 1,2,3,4,6-O-Pentagalloylglukose (PGG) (5 mg/ml) in Gegenwart von Gallussäure in Abhängigkeit von der Temperatur

Eine daran angelehnte Messreihe mit Methylgallat anstelle der Gallussäure wurde von B.Sc. P. Körner im Rahmen seiner Masterarbeit [Körner, 2015] aufgenommen und ist in Abb. 143 wiedergegeben.

Prinzipiell zeichnet sich auch in Gegenwart von Methylgallat ein analoger Zusammenhang ab. Mit steigender Methylgallatmenge und Temperatur wird die beobachtbare Trübung geringer, was für eine Reduktion der PGG-Fällung spricht. Oberhalb von 36 °C wird gar keine Fällung erkannt. Im Vergleich zu Gallussäure tritt die PGG-Fällung in diesem Fall aber erst bei deutlich niedrigeren Temperaturen auf und die Abhängigkeit in Relation zur vorliegenden Konzentration an Methylgallat scheint stärker ausgeprägt.

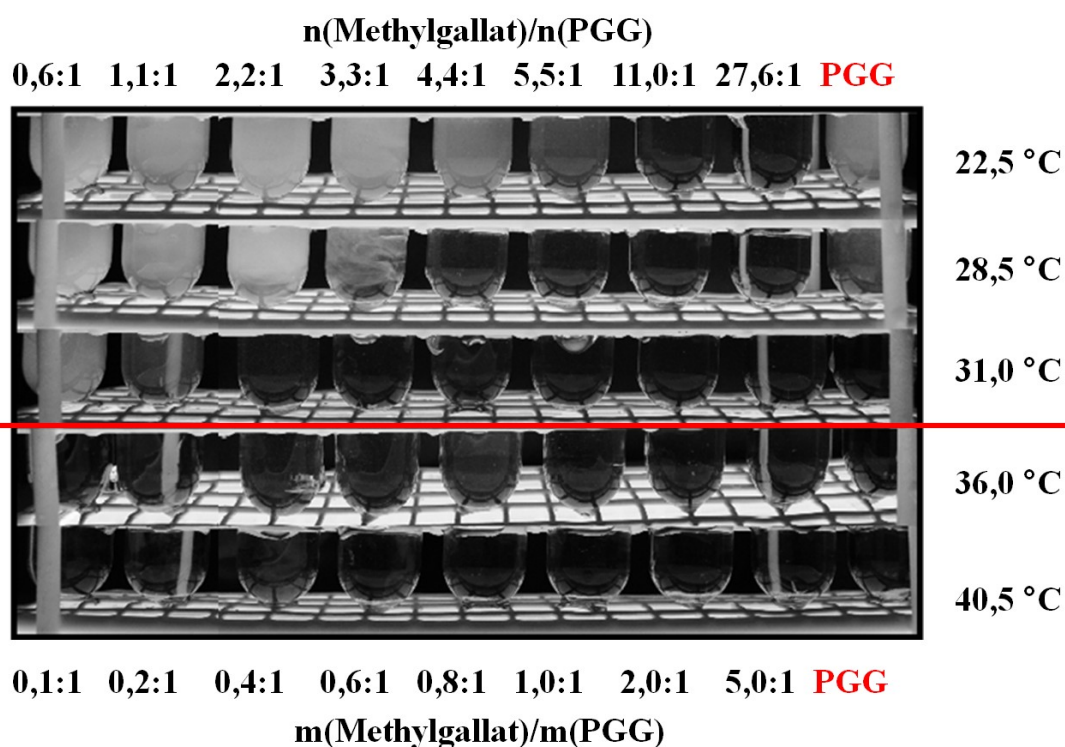


Abb. 143: Erstarrung von 1,2,3,4,6-Pentagalloylglukose (PGG) (5 mg/ml) in Gegenwart von Methylgallat in Abhängigkeit von der Temperatur [verändert aus Körner, 2015]

4.4 Strukturuntersuchungen an Komplexen von GnRH-Antagonisten mit Partnermolekülen

4.4.1 ATR-FTIR-Spektroskopie

4.4.1.1 Komplexe mit ausgewählten Polysacchariden

Die Komplexbildung zwischen Polysacchariden und GnRH-Antagonisten wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit exemplarisch an Cetorelix demonstriert. Komplexe von Cetorelix mit Chitosan wurden bereits früher in der Arbeitsgruppe mittels ATR-FTIR-Spektroskopie untersucht (vgl. Beil, 2012(1)). Abb. 144 veranschaulicht die wesentlichen dabei auftretenden Charakteristika. Zum einen nimmt die relative Intensität der dominanten C-O-Bande des Chitosans bei ca. 1000 cm^{-1} in den Komplexspektren proportional zum Chitosananteil im Ansatz zu, was indiziert, dass die gebildeten Komplexe keine feste Stöchiometrie aufweisen. Weiterhin verändert sich die Form der C-O-Bande in Abhängigkeit vom Ansatzverhältnis, was auf die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Peptid und Chitosan zurückgeführt wird. Die Amid I-Bande des GnRH-Antagonisten zeigt durch ihr scharfes Maximum bei ca. 1630 cm^{-1} zudem, dass das Peptid amyloid aggregiert in den Komplexen vorliegt (vgl. auch Abschnitt 4.1.1).

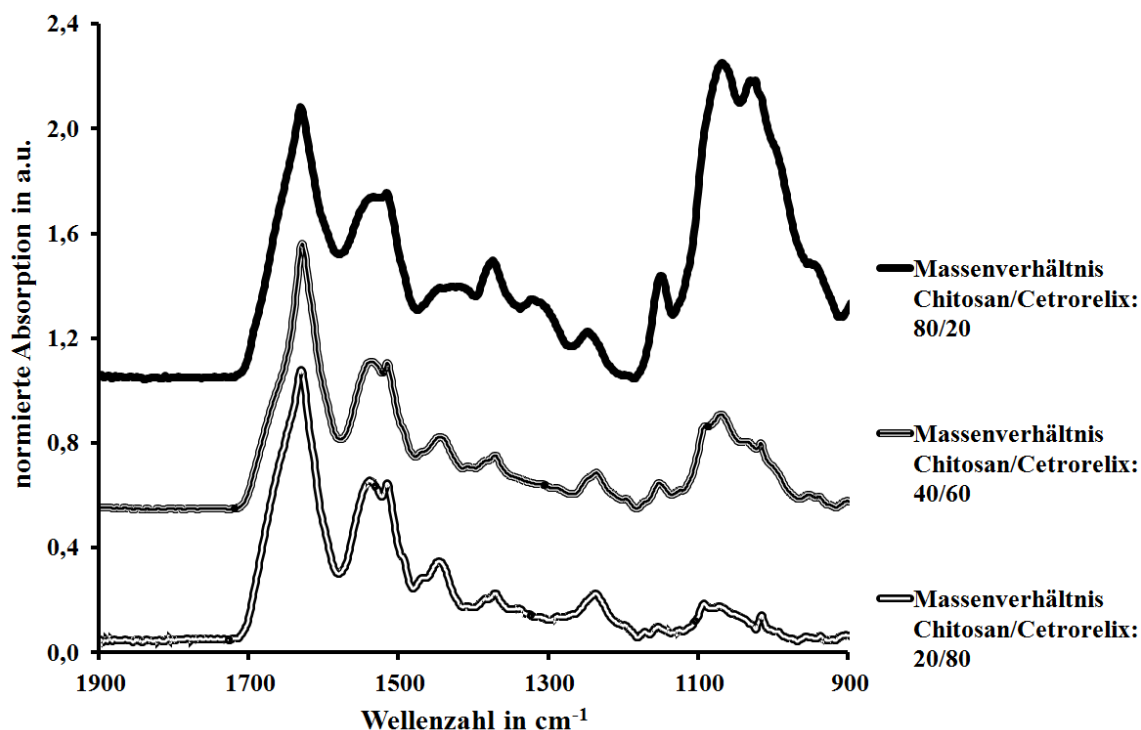


Abb. 144: ATR-FTIR-Spektren von Cetorelix-Chitosan-Komplexen bei variiertem Zusammensetzung beider Komponenten im Ansatz nach Fällung aus essigsaurer Lösung durch Neutralisation; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3

Auf Basis dieser Erkenntnisse ist zu vermuten, dass auch andere Polysaccharide mit Cetorelix analoge Komplexe bilden, da die polykationische Natur des Chitosans gegenüber dem ebenfalls kationisch vorliegenden Peptid keine stabilisierende Wirkung haben sollte.

In Abb. 145 sind ATR-FTIR-Spektren einer Serie analog präparierter Komplexe aus Dextran (40 kDa) und Cetorelix zu sehen. Erneut ist bei Normierung der Amid I-Bande eine systematische Zunahme der relativen Intensität der C-O-Banden des Polysaccharides mit Steigerung seines Anteils in der Ansatzlösung zu verzeichnen. Da das neutrale Polysaccharid Dextran allerdings unter diesen pH-Bedingungen im Gegensatz zu Chitosan nicht allein ausfallen würde, liegt hier ein eindeutiger Nachweis einer Interaktion mit dem Peptid vor. Bei Betrachtung der Amid I-Bande bei ca. 1630 cm^{-1} wird insbesondere bei hohem Cetorelix-Anteil die scharfe Bandenform der amyloiden Aggregate sichtbar. Eine Bandenformveränderung im Bereich der C-O-Banden des Polysaccharides ist hingegen nicht nachzuweisen.

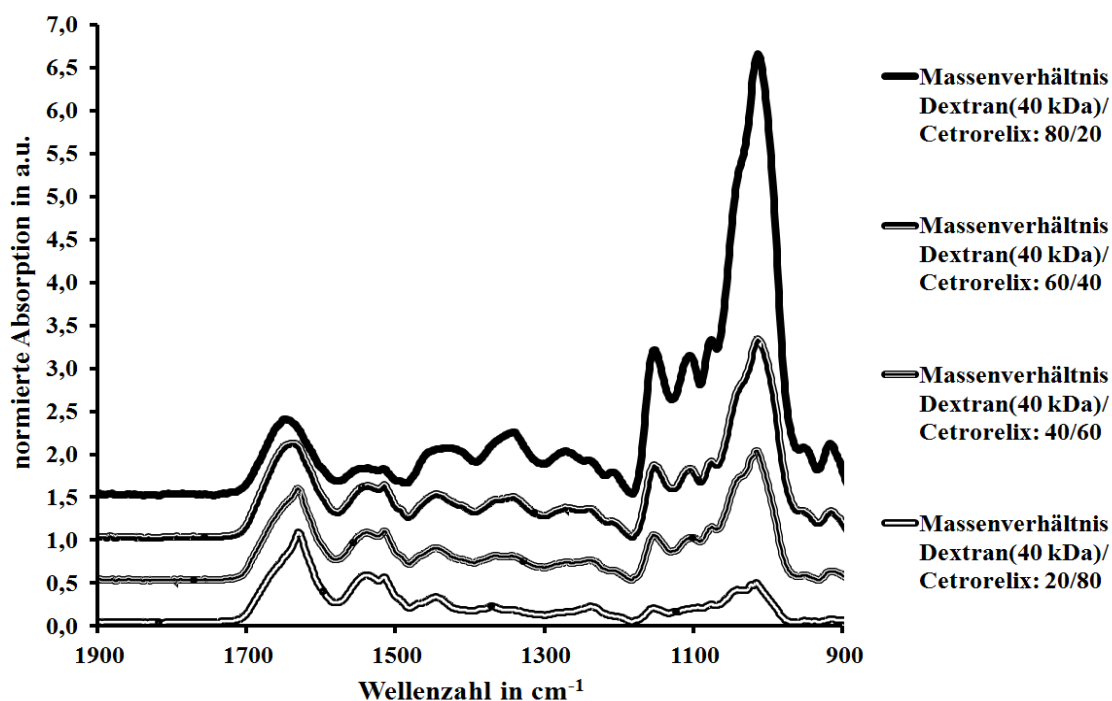


Abb. 145: ATR-FTIR-Spektren von Cetorelix-Dextran-Komplexen bei variierter Zusammensetzung beider Komponenten im Ansatz nach Fällung aus essigsaurer Lösung durch Neutralisation; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3

Die ATR-FTIR-Spektren von Cetorelix-Komplexen mit löslicher Stärke sind in Abb. 146 dargestellt. Der Zusammenhang zwischen dem eingesetzten Verhältnis beider Komponenten im Ansatz und den relativen Intensitäten der Banden beider Komponenten im Komplexspektrum ist wiederum evident. Die Bandenform der Amid I-Bande deutet zwar

ebenfalls auf aggregat-typische Strukturen, ist in diesem Fall jedoch nicht eindeutig zu bewerten, da die verschiedenen Stärkekomponten selbst jeweils Banden im entsprechenden Bereich aufweisen, die zu einer störenden Überlagerung führen.

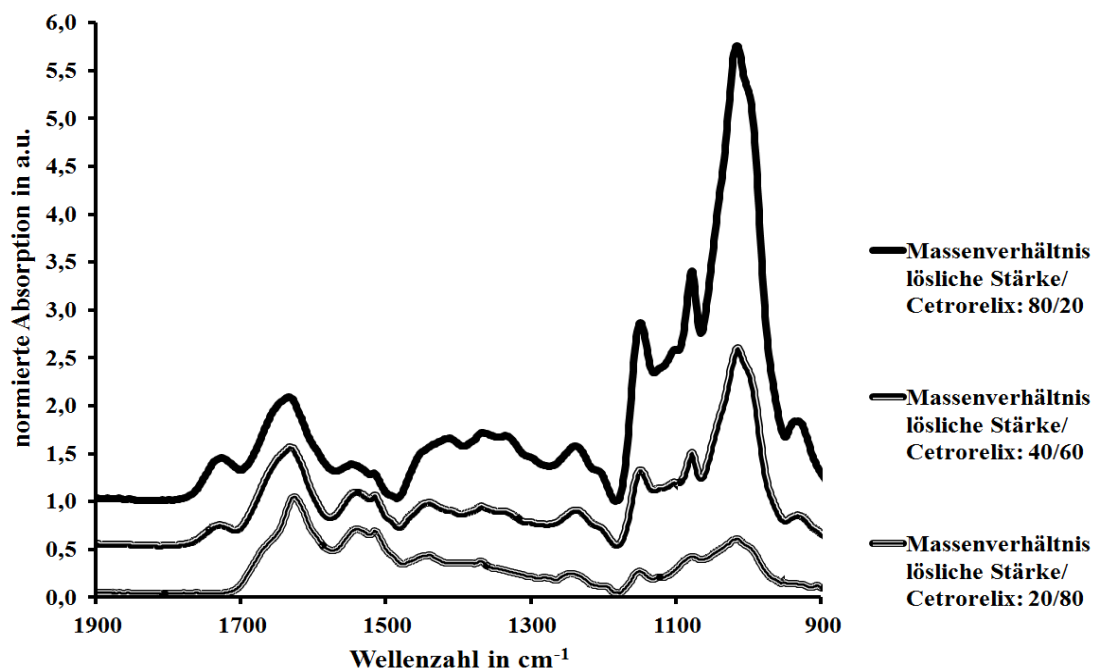


Abb. 146: ATR-FTIR-Spektren von Cetrerelix-Stärke-Komplexen bei variiertter Zusammensetzung beider Komponenten im Ansatz nach Fällung aus essigsaurer Lösung durch Neutralisation; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3

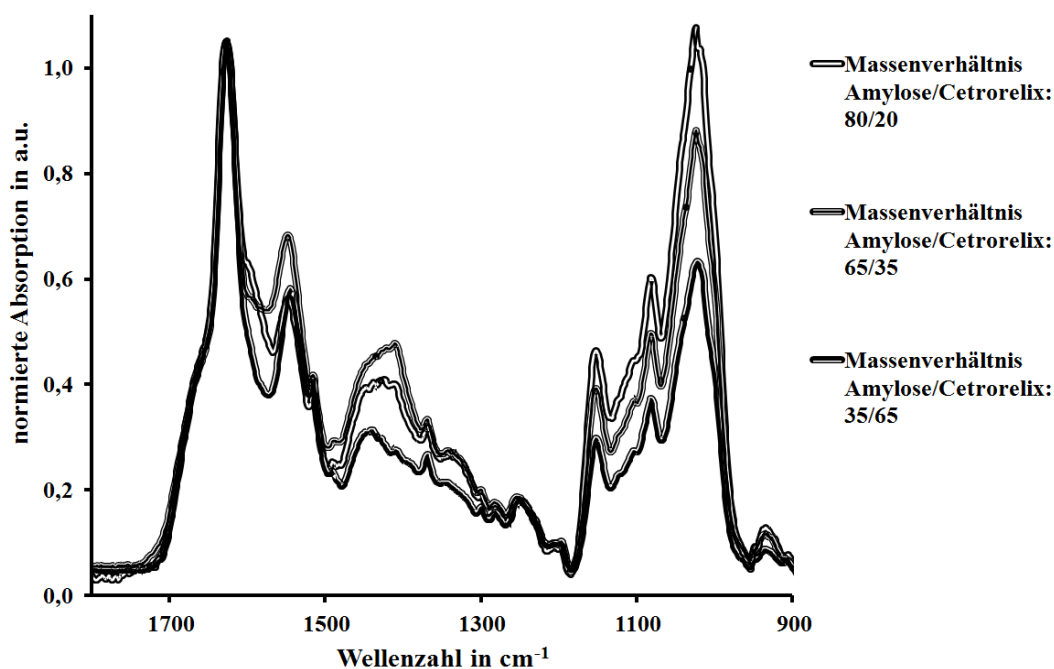


Abb. 147: ATR-FTIR-Spektren von Cetrerelix-Amylose-Komplexen bei variiertter Zusammensetzung beider Komponenten im Ansatz nach Fällung aus essigsaurer Lösung durch Neutralisation; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3

Betrachtet man die ATR-FTIR-Spektren von Komplexen aus Cetorelix und reiner Amylose in Abb. 147, so ist die Bandenvielfalt im Bereich der Amid I-Bande deutlich geringer als im Fall von löslicher Stärke. Hierbei liegen ganz eindeutig hochgradig amyloid aggregierte Strukturen von Cetorelix im Komplex vor. Das Fehlen einer festen Stöchiometrie bestätigt sich auch in diesem Fall und ist somit offenbar als allgemeingültig für Cetorelix-Komplexe mit Polysacchariden zu betrachten.

Abb. 148 zeigt einen Vergleich zwischen den Bandenformen reiner Amylose und eines Cetorelix-Amylose-Komplexes. Es ist offenkundig, dass die Form der C-O-Banden der reinen Amylose von denen im Komplex abweicht, was zumindest auf eine veränderte Umgebung der Hydroxylgruppen des Polysaccharides hindeutet.

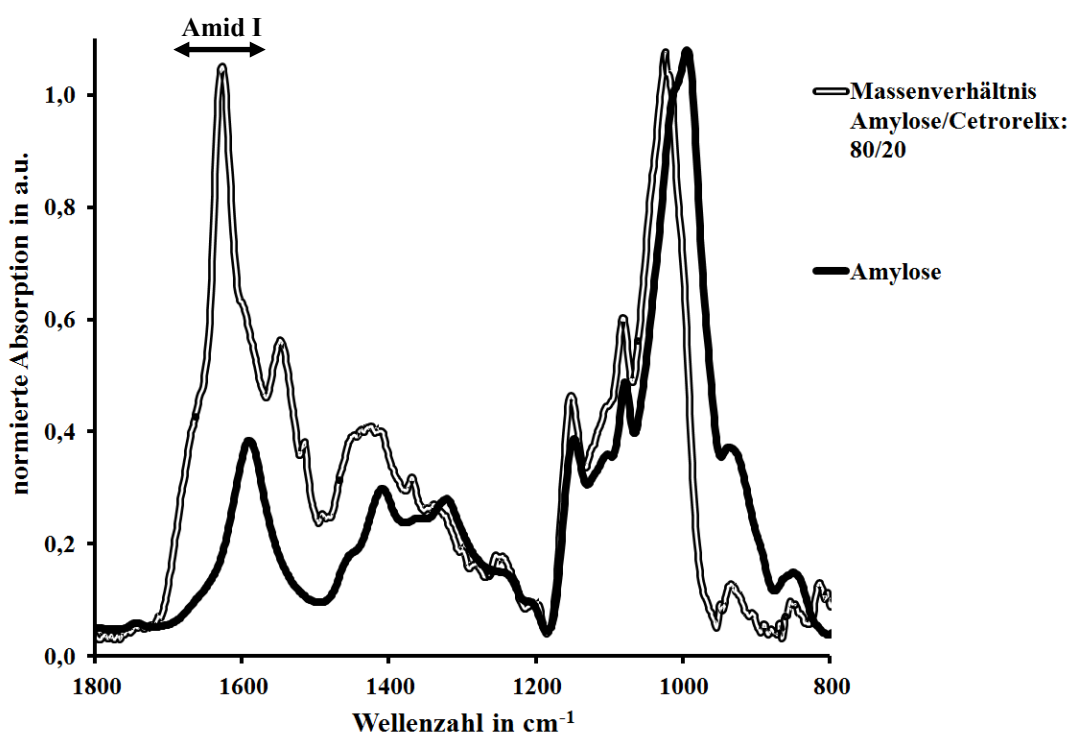


Abb. 148: Vergleichende Gegenüberstellung der ATR-FTIR-Spektren von reiner Amylose und einem Cetorelix-Amylose-Komplex; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3

Für neutrale Polysaccharide als Komplexpartner wird im Gegensatz zu Chitosan auch eine Komplexbildung mit Cetorelix im sauren Milieu beobachtet. Dieses Phänomen geht sogar soweit, dass eine Präzipitation bei pH 3,0 erfolgt. Unter diesen Bedingungen ist die amyloide Aggregation des Peptides stark gehindert, wie in Abb. 32 in Abschnitt 4.1.1.3 zu erkennen ist. Daher lohnt ein Blick auf die Amid I-Bande des Peptides in solch einem Komplex. Die entsprechenden ATR-FTIR-Spektren sind Abb. 149 zu entnehmen.

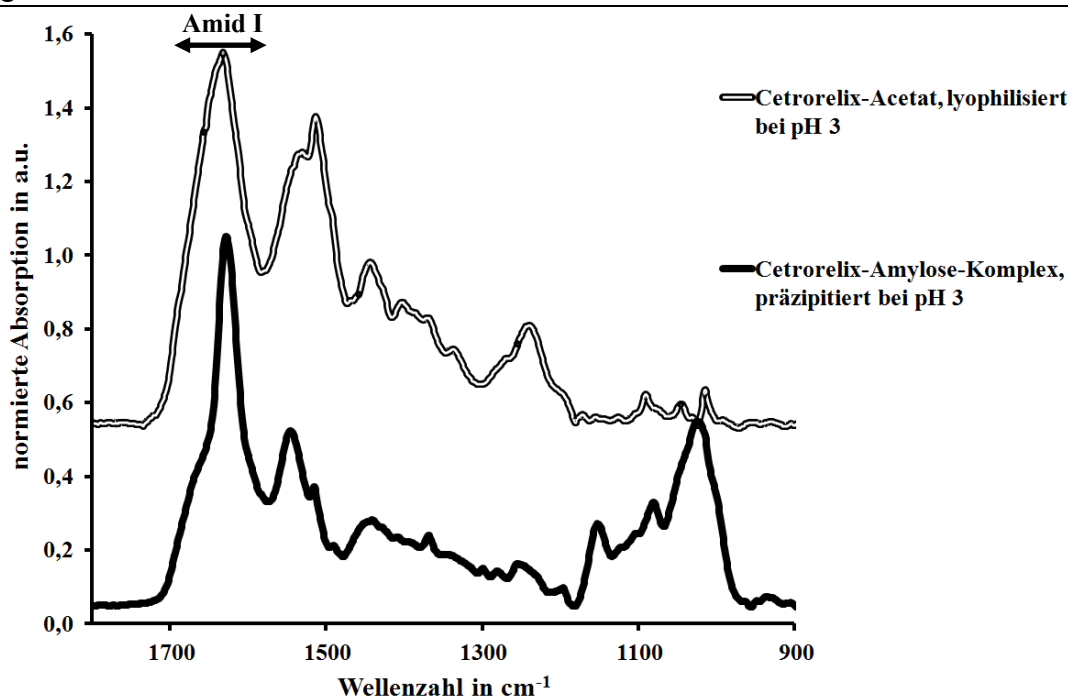


Abb. 149: Vergleichende Gegenüberstellung der ATR-FTIR-Spektren von Cetorelix-Acetat und einem Cetorelix-Amylose-Komplex, welche bei pH 3,0 präzipitiert bzw. lyophilisiert wurden; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3

Es ist klar zu erkennen, dass die Amid I-Bande des Peptides im Komplex die typische scharfe Bandenform einer von β -Faltblatt-Strukturen dominierten Aggregation aufweist, wohingegen das Peptid allein unter diesen pH-Konditionen die breite Bandenform einer ungeordneten Zufallsknäuelstruktur zeigt. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass Amylose die amyloide Aggregation des Peptides fördert.

4.4.1.2 Anti-amyloide Komplexe mit Poly-L-Glutamat und der Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis*

Poly-L-Glutamat und auch die Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* werden in der vorliegenden Arbeit als potentielle Inhibitoren der amyloiden Aggregation von GnRH-Antagonisten untersucht, wodurch der infrarotspektroskopischen Analyse der Amyloidbildung eine besondere Bedeutung zukommt. Für die dargestellten Ergebnisse dient Cetorelix als exemplarischer GnRH-Antagonist.

Wie bereits aus Abschnitt 4.1.1.3 hervorgeht, tritt die Amyloidbildung von Cetorelix stark pH-abhängig auf. So ist bei einem pH-Wert von 3,0 auch nach längerer Zeit keine entsprechende Aggregation zu verzeichnen, während bei 7,0 die Aggregation spontan einsetzt. Daher ist es für eine nähere Betrachtung einer potentiellen Beeinflussung dieses Prozesses

von erheblicher Bedeutung, die Konditionen für den Zusatz des Additivs bzw. der Komplexpartner zum GnRH-Antagonisten unter Berücksichtigung des pH-Einflusses zu variieren.

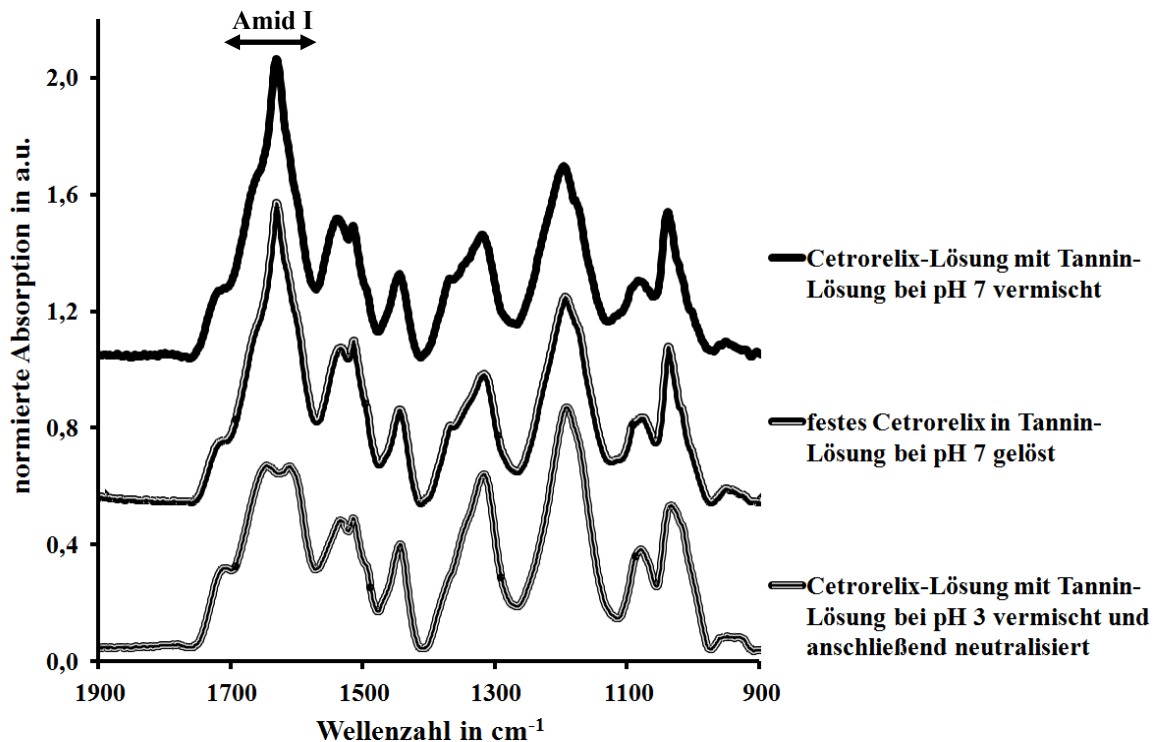


Abb. 150: ATR-FTIR-Spektren von Cetorelix-Komplexen mit der ungetrennten Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* (in der Abbildung "Tannin" genannt) in Abhängigkeit von den Präparationsbedingungen; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3

In Abb. 150 sind dementsprechend ATR-FTIR-Spektren von Komplexen aus Cetorelix und der Gallotanninmischung in Abhängigkeit von der Präparation dargestellt. Die durch das oberste Spektrum repräsentierte Vereinigung beider Komplexpartner aus separat neutralisierten Stammlösungen führt offensichtlich zu einer schmalen Amid I-Bande bei ca. 1630 cm^{-1} , was eine partielle Amyloidbildung indiziert. Da bereits dargestellt wurde, dass bei diesem pH-Wert Cetorelix selbst schon aggregiert vorliegt, ist zu konstatieren, dass die bereits existenten Aggregate durch Zugabe der Gallotanninmischung nicht vollständig wieder deaggregiert werden.

Das mittlere Spektrum zeigt den resultierenden Komplex für den Fall, dass das lyophilisierte Cetorelix-Acetat, welches nach Abschnitt 4.1.1.1 keine amyloiden Bestandteile enthält, in einer bereits Gallotannin-haltigen Lösung bei pH 7,0 gelöst wird. Da auch im zugehörigen ATR-FTIR-Spektrum eine amyloid-typische Amid I-Bandenform erkennbar ist, bleibt

festzuhalten, dass auch unter diesen Konditionen keine vollständige Vermeidung der Aggregatbildung von Cetrorelix durch einen Zusatz an Gallotanninmischung erreicht wird.

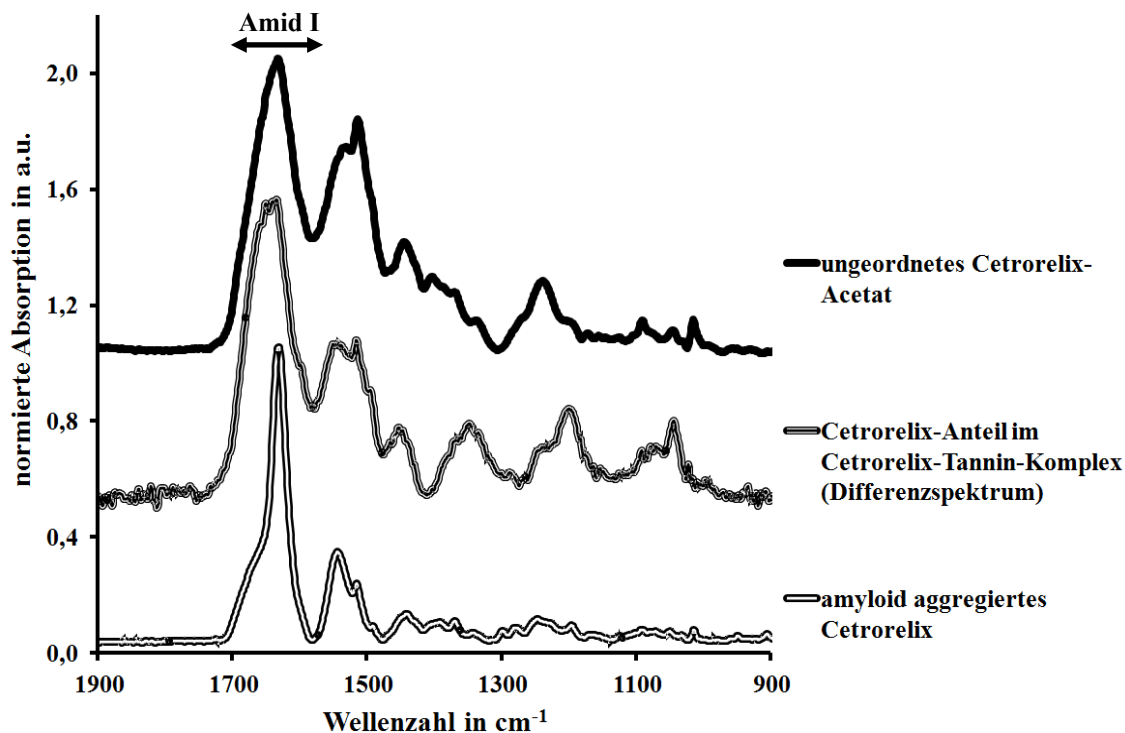


Abb. 151: Vergleichende Gegenüberstellung der ATR-FTIR-Spektren des Cetrorelix-Anteils aus dem Cetrorelix-Tannin-Komplex, der nach einer Interaktionsphase bei pH 3,0 resultiert, und der Spektren von ungeordnetem sowie amyloid-aggregiertem Cetrorelix; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3

Das dritte ATR-Spektrum in Abb. 150 demonstriert das Verhalten des Systems, wenn beide Komponenten zunächst bei pH 3,0 vereinigt und die resultierende Mischung erst nach einer bestimmten Interaktionszeit auf pH 7,0 eingestellt wird. In diesem Fall unterscheidet sich die Form der Amid I-Bande drastisch von den zuvor besprochenen Präparationsvarianten. Da der entsprechende Spektralbereich jedoch von tannin-inhärenten Banden deutlich überlagert wird und somit eine genaue Beurteilung der Amid I-Bande des Peptides kaum möglich ist, wird in Abb. 151 das korrespondierende Differenzspektrum des Komplexes dargestellt, welches bei Abzug des reinen Tanninspektrums erhalten wird. Bei einem Vergleich mit den ebenfalls abgebildeten Spektren von aggregiertem und ungeordnetem Cetrorelix ist klar ersichtlich, dass die breite Amid I-Bande des Komplexes stark mit der ungeordneten Bandenform korreliert, während die charakteristisch schmalen Bandenanteile der amyloiden β -Faltblatt-Strukturen kaum nachweisbar sind.

Offenkundig ermöglicht die Interaktionsphase bei pH 3,0 eine Komplexbildung, welche auch unter im Nachgang veränderten Konditionen die Aggregation von Cetorelix effektiv unterdrückt.

Poly-L-Glutamat ist bei pH 3,0 in wässrigen Solventien schlecht löslich, weshalb ein Zusatz dieses Additivs sinnvollerweise erst bei pH 7,0 erfolgen kann. Abb. 152 veranschaulicht die ATR-FTIR-Spektren von zwei verschiedenen Dreikomponenten-Komplexen aus Cetorelix, der Gallotanninmischung und Poly-L-Glutamat. Dabei erfolgt die Vereinigung von Cetorelix und Gallotanninmischung im ersten Fall bei pH 7,0, im zweiten Fall hingegen bei pH 3,0. Poly-L-Glutamat wird in beiden Fällen abschließend bei pH 7,0 zugesetzt.

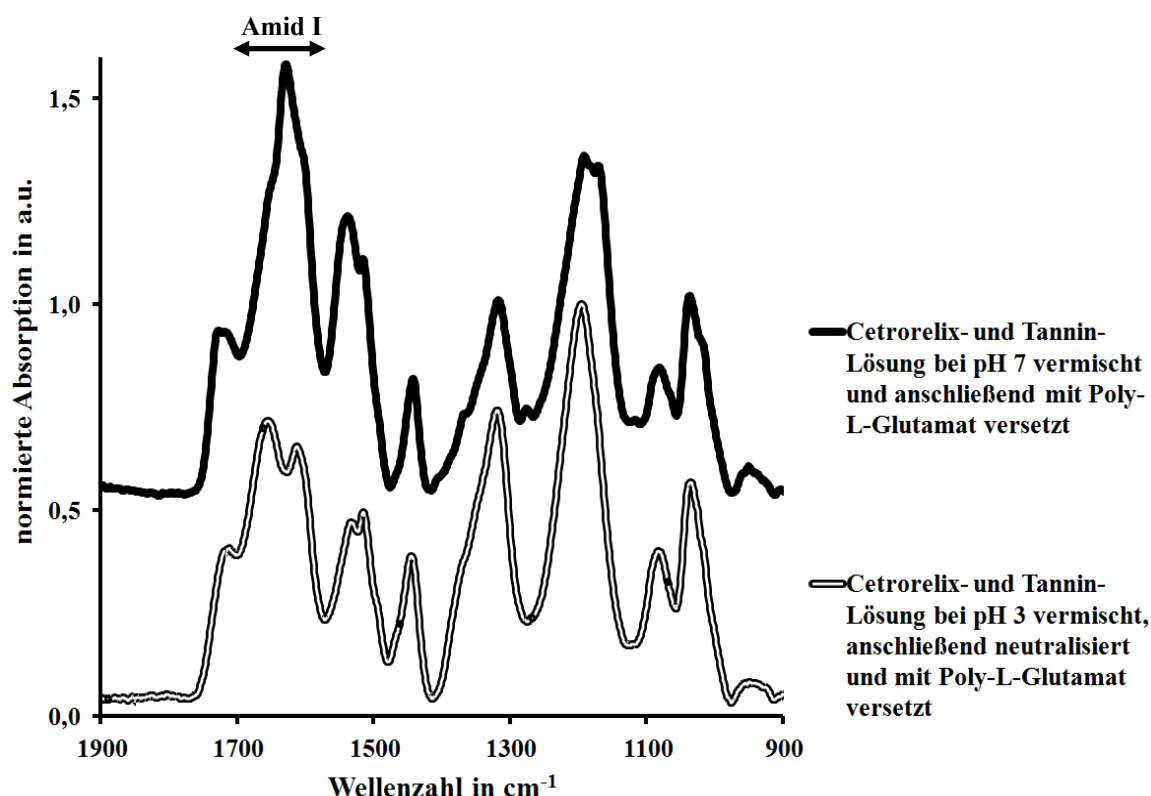


Abb. 152: ATR-FTIR-Spektren von Dreikomponenten-Komplexen aus Cetorelix, der Gallotanninmischung und Poly-L-Glutamat in Abhängigkeit von der Präparation der Komplexe; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3

Es bestätigt sich die Erkenntnis, dass nur bei einer Interaktionsphase von Cetorelix und Gallotanninmischung bei pH 3,0 das amyloid-typische Verhalten der Amid I-Bande zu verhindern ist. Ein signifikanter Einfluss des Poly-L-Glutamats ist nicht ersichtlich.

4.4.1.3 Komplexe mit Tanninfraktionen

Alle in Abschnitt 4.3.1.3 dargestellten, mithilfe semi-präparativer HPLC gewonnenen Teilfraktionen der Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* werden als Komplexpартner für die GnRH-Antagonisten Cetrorelix, Ozarelix und Teverelix untersucht.

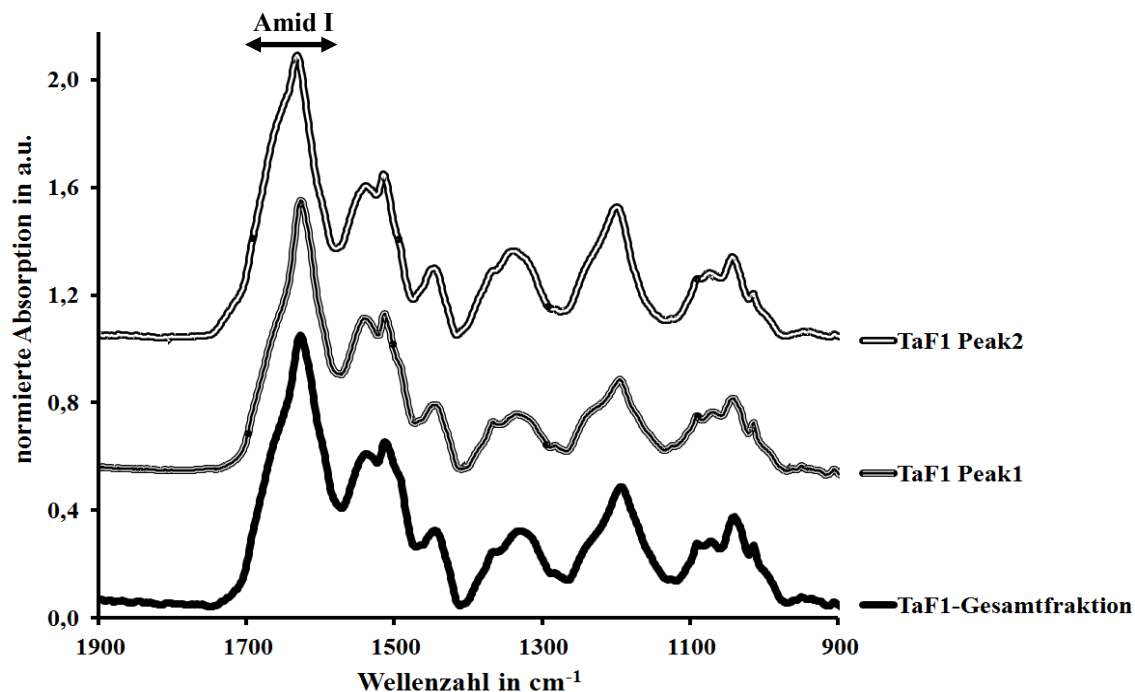


Abb. 153: ATR-FTIR-Spektren von Cetrorelix-Komplexen mit Tanninfraktion TaF1 und deren Teilfraktionen; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3

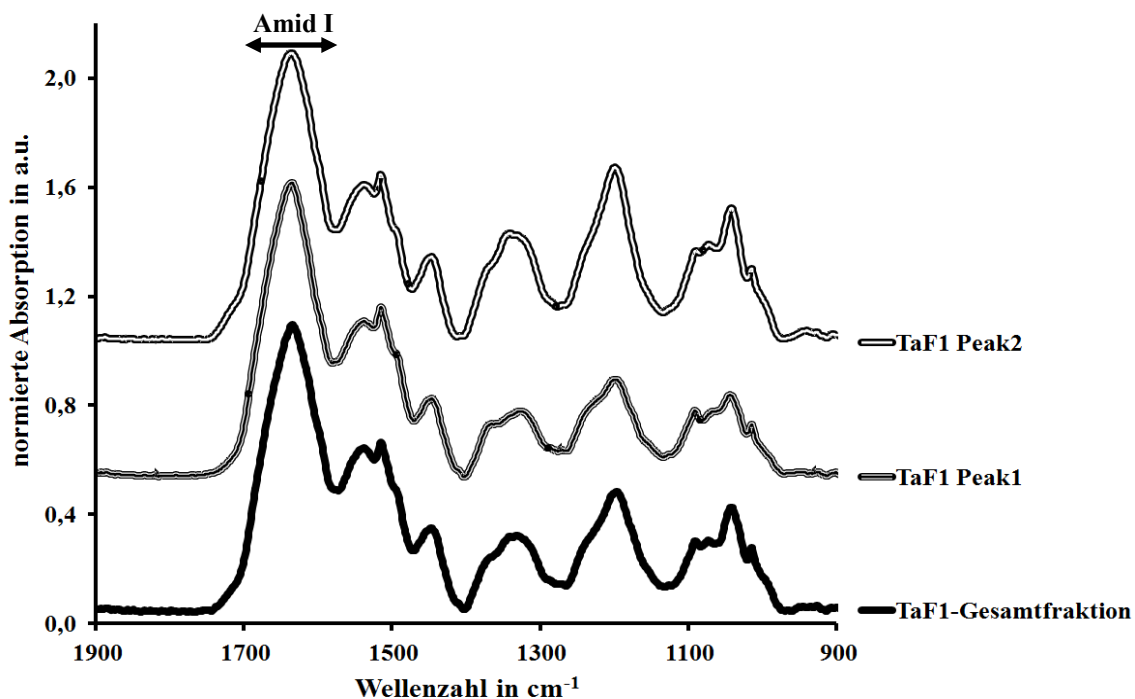


Abb. 154: ATR-FTIR-Spektren von Ozarelix-Komplexen mit Tanninfraktion TaF1 und deren Teilfraktionen; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3

Da die Ergebnisse für Cetorelix und Teverelix sehr ähnlich ausfallen, werden an dieser Stelle lediglich die Resultate für Cetorelix und Ozarelix im Detail besprochen. Die korrespondierenden Graphiken für Teverelix können dem Anhang in Abschnitt 10.5 entnommen werden.

Die ATR-FTIR-Spektren von Cetorelix-Komplexen mit der Tanninfraktion TaF1 und deren Teilfraktionen TaF1_Peak1 und TaF1_Peak2 sind in Abb. 153 zu sehen. Im Vergleich dazu sind die Spektren der korrespondierenden Komplexe mit Ozarelix in Abb. 154 dargestellt. Die Phenolbanden der Tanninfraktionen, welche zwischen 1100 cm^{-1} und 1400 cm^{-1} auftreten, sind in allen Spektren deutlich weniger intensiv als die Amid I-Bande bei ca. 1640 cm^{-1} , was dafür spricht, dass der Peptidanteil in den betrachteten Komplexen den Tanninanteil in Hinblick auf die entsprechenden Massenanteile deutlich übersteigt.

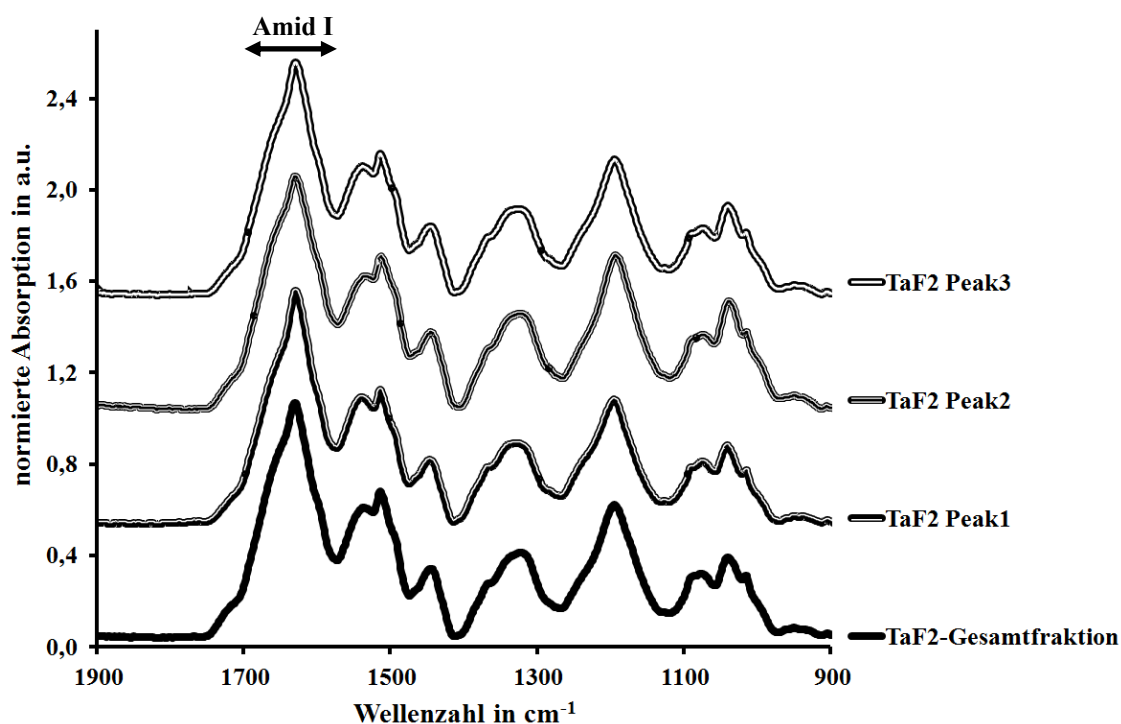


Abb. 155: ATR-FTIR-Spektren von Cetorelix-Komplexen mit Tanninfraktion TaF2 und deren Teilfraktionen; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3

Bei näherer Betrachtung der Amid I-Bande fällt auf, dass die Bandenform im Falle der Ozarelix-Komplexe recht symmetrisch und breit erscheint, wohingegen sich in den Cetorelix-Komplexen die scharfe Amyloid-Bande bei 1630 cm^{-1} markant aus der Bandenformation erhebt. Daher ist bereits hieraus zu erkennen, dass die Verringerung des Amyloidgehaltes durch die Komplexbildung mit Tanninfraktion TaF1 im Falle von Ozarelix deutlich effektiver ist als im Falle von Cetorelix. Für Cetorelix ist zudem erkennbar, dass die

Amid I-Bande im Komplex mit der Teilfraktion TaF1_Peak1 offensichtlich einen höheren β -Faltblatt-Anteil aufweist als in dem entsprechenden Komplex mit der Teilfraktion TaF1_Peak2, sodass letztgenannte Teilfraktion als effektiverer Aggregationsinhibitor auftritt. Eine Übersicht der ATR-FTIR-Spektren von Komplexen mit Tanninfraktion TaF2 ist für Cetorelix in Abb. 155 und für Ozarelix in Abb. 156 gegeben.

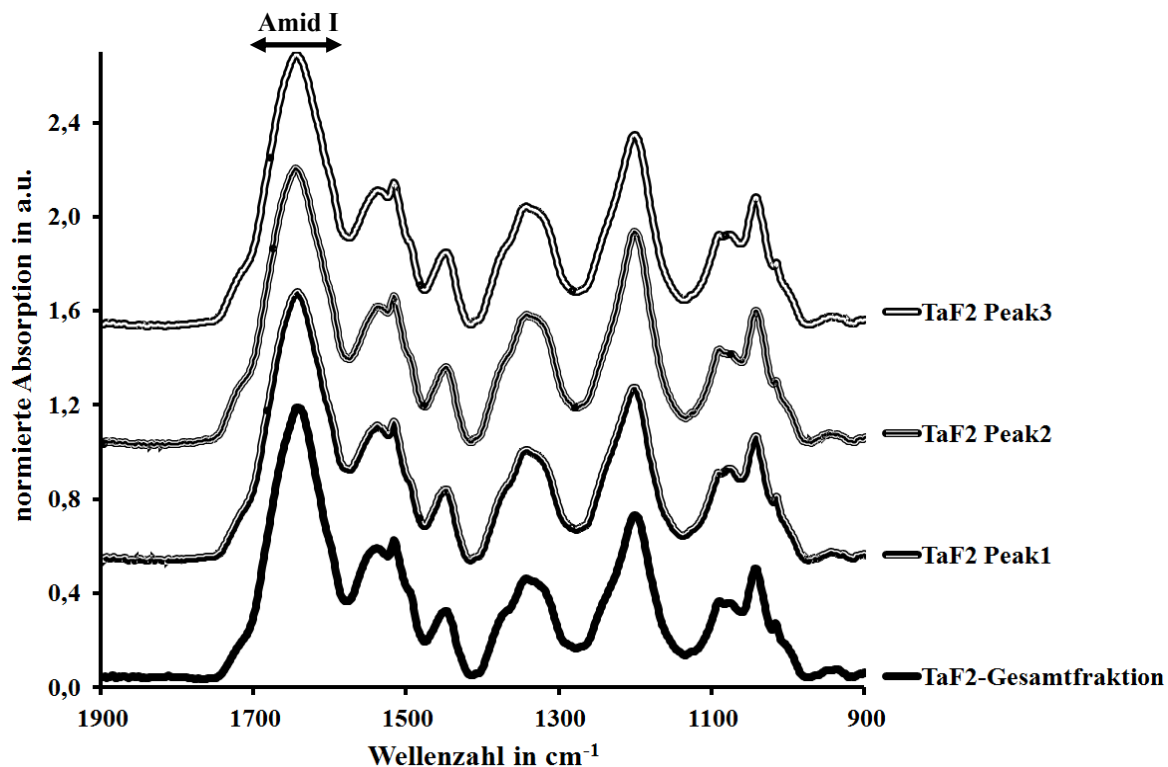


Abb. 156: ATR-FTIR-Spektren von Ozarelix-Komplexen mit Tanninfraktion TaF2 und deren Teilfraktionen; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3

Erneut weist die Amid I-Bande der Ozarelix-Komplexe deutlich geringere Anzeichen einer amyloiden Aggregation auf als diejenige der Cetorelix-Komplexe. Im Fall der Cetorelix-Komplexe ist die charakteristische Bande bei ca. 1630 cm^{-1} zwar eindeutig zu erkennen, allerdings fällt sie geringer aus als in den Spektren der Komplexe mit Tanninfraktion TaF1. Insofern erweisen sich die Teilfraktionen von Tanninfraktion TaF2 als effektivere Aggregationsinhibitoren, wenngleich immer noch ein signifikanter Amyloidgehalt in den Spektren zu erkennen ist. Anhand des Verhältnisses zwischen Phenolbanden und Amid I-Bande ist erneut offenkundig, dass der Peptidanteil in diesen Komplexen stark überwiegt.

Die ATR-FTIR-Spektren der Komplexe mit den Teilfraktionen der Tanninfraktion TaF3 können in Abb. 157 für Cetorelix, sowie in Abb. 158 für Ozarelix betrachtet werden. In diesem Fall ist der relative Tanninanteil im Komplex erheblich höher, als es für die Tanninfraktionen TaF1 und TaF2 beobachtet wird, wie leicht an den deutlicher

hervortretenden Phenolbanden zu bemerken ist. Die β -Faltblatt-typische Form der Amid I-Bande ist weder für Ozarelix noch für Cetrorelix in ausgeprägter Form vorhanden, was für eine hohe Effizienz in Bezug auf die Aggregationshemmung durch diese Tanninfraktion spricht. Diese Feststellung gilt allgemeingültig für alle untersuchten GnRH-Antagonisten.

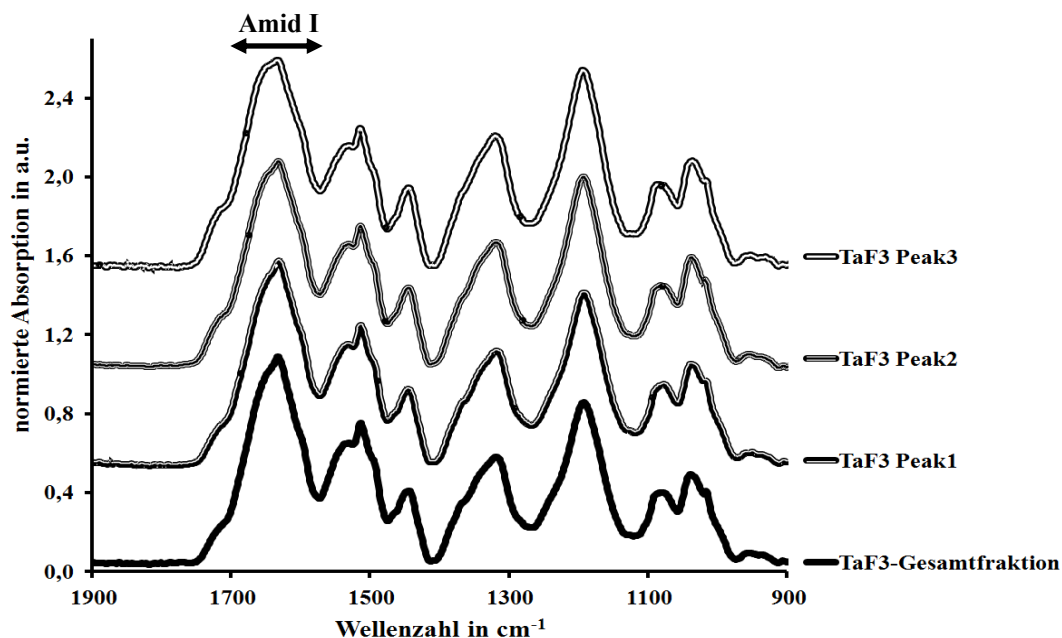


Abb. 157: ATR-FTIR-Spektren von Cetrorelix-Komplexen mit Tanninfraktion TaF3 und deren Teilfraktionen; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3

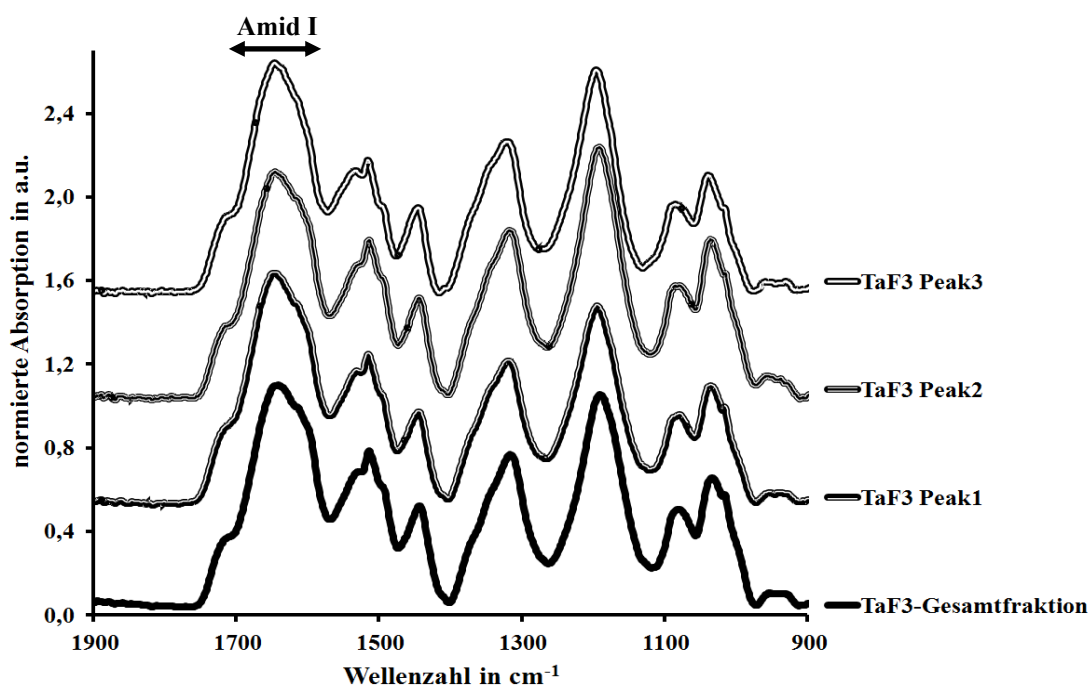


Abb. 158: ATR-FTIR-Spektren von Ozarelix-Komplexen mit Tanninfraktion TaF3 und deren Teilfraktionen; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3

Die letzte zu betrachtende Tanninfraktion ist TaF4. Die dazugehörigen Komplexe sind für Cetorelix in Abb. 159 und für Ozarelix in Abb. 160 wiedergegeben. Die intensiven Phenolbanden der Komplexe indizieren einen hohen relativen Tanninanteil im Komplex. Die Form der Amid I-Bande deutet sowohl für die Cetorelix- als auch für die Ozarelix-Komplexe auf geringe Amyloid-Gehalte, was diese Tanninfraktion ebenfalls als effektiven Inhibitor einer solchen Peptidaggregation ausweist.

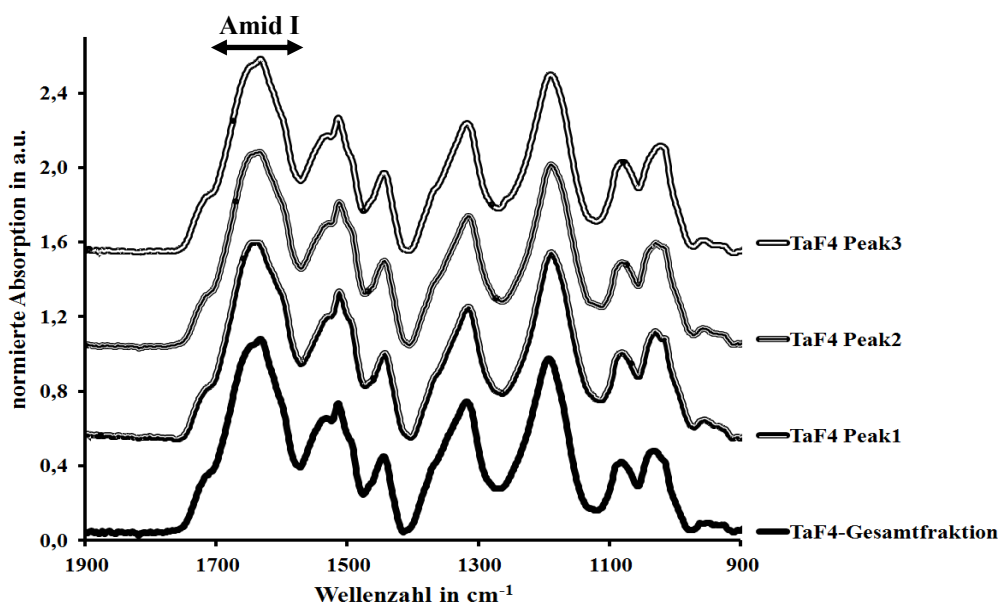


Abb. 159: ATR-FTIR-Spektren von Cetorelix-Komplexen mit Tanninfraktion TaF4 und deren Teilfraktionen; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3

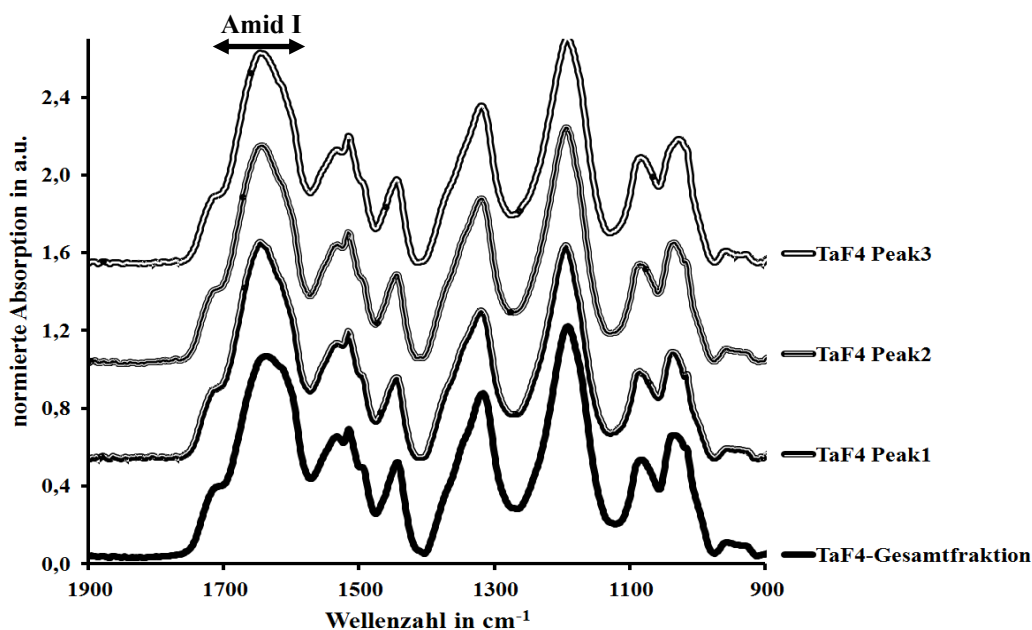


Abb. 160: ATR-FTIR-Spektren von Ozarelix-Komplexen mit Tanninfraktion TaF4 und deren Teilfraktionen; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3

4.4.2 Struktureffekte in Formulierungen von GnRH-Antagonisten mit Polysacchariden

4.4.2.1 pH-Abhängigkeit der Präzipitation von Amylose-Cetorelix-Komplexen

In Abschnitt 4.4.1.1 wurde bereits im Zusammenhang mit infrarotspektroskopischen Untersuchungen an Cetorelix-Amylose-Komplexen auf das interessante Phänomen hingewiesen, dass sich solche Komplexe bereits bei pH 3,0 in Form einer makroskopisch sichtbaren Präzipitation manifestieren. Zum besseren Verständnis ist es notwendig, die pH-Abhängigkeit der Fällung solcher Systeme näher zu betrachten.

Im linken Teil von Abb. 161 sind die prozentualen Anteile des im gebildeten Präzipitat enthaltenen Cetorelix bei einer schrittweisen Erhöhung des pH-Wertes in einem System aus Amylose und Cetorelix visualisiert. Es geht daraus hervor, dass bereits bei pH 3,0 ca. 30 % des GnRH-Antagonisten aus der Lösung gefällt werden, obwohl das Peptid allein unter diesen Konditionen weder bemerkbar aggregieren, noch ausfallen würde. Bei Erhöhung des pH-Wertes auf 4,0 erfolgt bereits eine mehr als 90 %ige Fällung des Peptides.

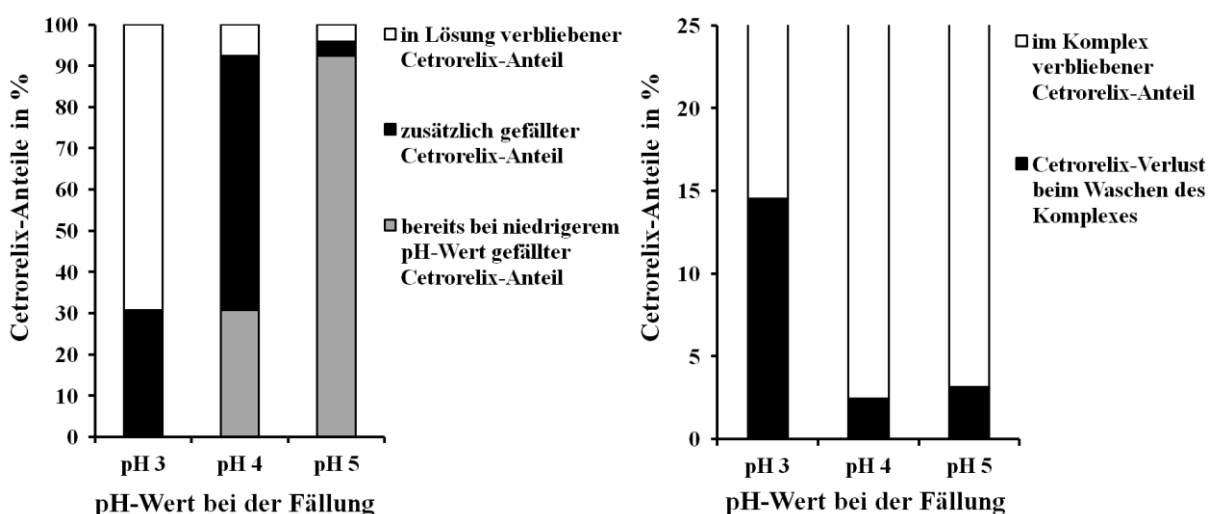


Abb. 161: Quantifizierung der pH-abhängig präzipitierten Cetorelix-Menge in Gegenwart von Amylose (links) und Stabilität der resultierenden Komplexe gegenüber einem Waschschritt mit Reinstwasser (rechts); vgl. Abschnitt 3.17.3

Die Stabilität der erhaltenen Komplexe ist im rechten Teil der Abbildung dargestellt. Dabei wird offenkundig, dass der bei pH 3,0 gefällte Komplex deutlich labiler gegenüber einem Waschschritt mit Reinstwasser ist, als die bei höheren pH-Werten präzipitierten Produkte. Die zur Fällung führende Interaktion der beiden Komplexpartner wird demnach bei Überschreiten des für die amyloide Aggregation kritischen pH-Wertes zwischen 3,0 und 4,0 signifikant verstärkt.

4.4.2.2 Viskosität von Cetrorelix und verschiedenen Polysacchariden

Die Viskosität ist in Formulierungen mit Polysacchariden und Peptiden von erheblicher Bedeutung für die Diffusionseigenschaften der daraus gebildeten Wirkstoffformulierungen. Die pH-Abhängigkeit der spezifischen Viskosität der für die vorliegende Arbeit wesentlichen Polysaccharide *lmw* Chitosan und Amylose sowie exemplarisch für den GnRH-Antagonisten Cetrorelix sind in Abb. 162 zu finden (Durchführung gemäß Abschnitt 3.17.1).

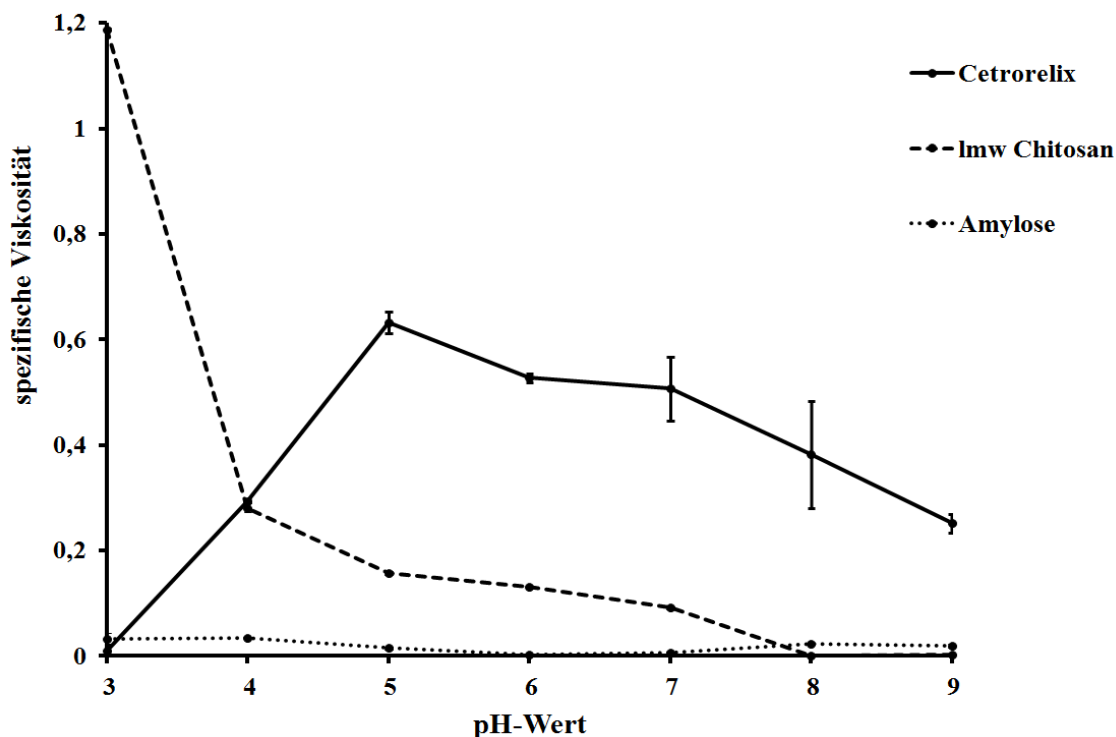


Abb. 162: pH-Abhängigkeit der spezifischen Viskosität von Amylose, *lmw* Chitosan und Cetrorelix bei einer jeweiligen Konzentration von 1 mg/ml

Die Viskosität der Cetrorelix-Lösung steigt nach Überschreiten des für die amyloide Aggregation kritischen pH-Wertes zwischen 3,0 und 4,0 zunächst drastisch an, was mit einiger Sicherheit auf die Fibrillenbildung zurückzuführen ist. Oberhalb von pH 5,0 nimmt die Viskosität schrittweise mit steigendem pH-Wert ab.

Chitosan weist aufgrund seiner polykationischen Natur bei sehr niedrigen pH-Werten eine hohe Rigidität auf, was zu der beobachteten hohen Viskosität führt. Mit steigendem pH-Wert nimmt die Viskosität ab. Das Verschwinden einer messbaren Viskosität oberhalb von pH 7,0 muss im Kontext der erfolgenden Fällung des Polysaccharides verstanden werden.

Eine Amylose-Lösung weist im Vergleich dazu kaum eine beachtenswerte Viskosität im betrachteten Konzentrationsbereich auf.

4.4.2.3 Der Einfluss von Stärkekomponenten auf den Aggregationszustand von Cetrorelix

Für die Untersuchungen an Komplexen von Cetrorelix mit Stärkekomponenten wurden Amylose und Amylopektin durch Dipl.-Ing. A. Seifert an der Professur für Energieverfahrenstechnik der TU Dresden nach einem eigens entwickelten, aber zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch unveröffentlichten Verfahren aus Kartoffelstärke isoliert. Beide Komponenten liegen nach der Isolierung jeweils in einem wasserhaltigen Gel vor. Für die Amylosekomponente werden mehrere Trocknungsverfahren getestet, deren Resultate anhand der ATR-FTIR-Spektren in Abb. 163 verdeutlicht werden sollen.

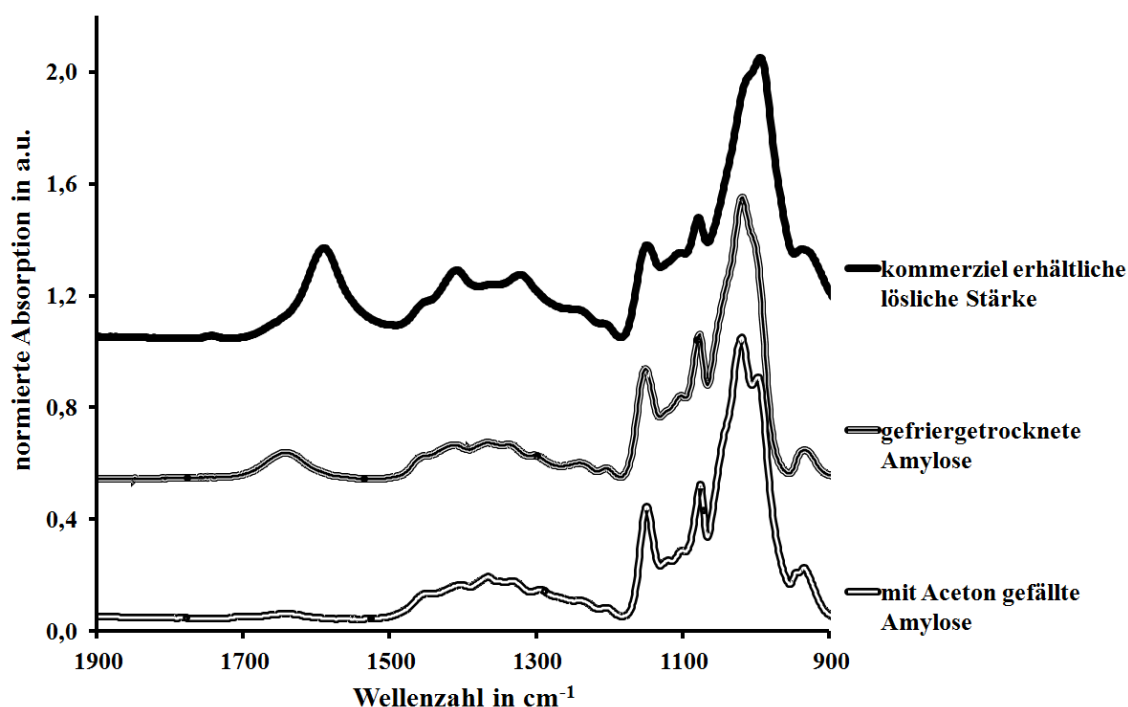


Abb. 163: ATR-FTIR-Spektren von löslicher Stärke und nach unterschiedlichen Verfahren getrockneter Amylose; Präparation siehe Abschnitt 3.4.2 und 3.4.3

Zwischen 1500 cm^{-1} und 1700 cm^{-1} tritt in kommerziell erhältlicher, löslicher Stärke eine markante Bande auf, welche in gefriergetrockneter bzw. durch Acetonzugabe gefällter Amylose nicht mehr in dieser Intensität detektierbar ist. Es handelt sich hierbei offensichtlich um strukturell gebundenes Wasser, das insbesondere durch die Acetonbehandlung annähernd quantitativ entfernt werden kann. Für alle Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wird daher ausschließlich nach letztgenanntem Verfahren prozessierte Amylose verwendet.

Amylopektin lässt sich mithilfe von Aceton nicht effizient fällen, weshalb in diesem Fall ausschließlich Lyophilisation zur Trocknung verwendet wird. Bei einer zeitabhängigen

Untersuchung der ATR-FTIR-Spektren des Amylopektingels tritt eine merkliche Alterung des Materials zu Tage, was anhand der Spektrenfolge in Abb. 164 nachvollzogen werden kann. Die abgebildeten C-O-Banden des Polysaccharides zeigen eine systematische Formveränderung über den Untersuchungszeitraum, der für eine Umgruppierung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den aliphatischen Hydroxylgruppen des Polysaccharides spricht. Infolge dieser Erkenntnis wird stets frisch vorbereitetes Amylopektin für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit verwendet.

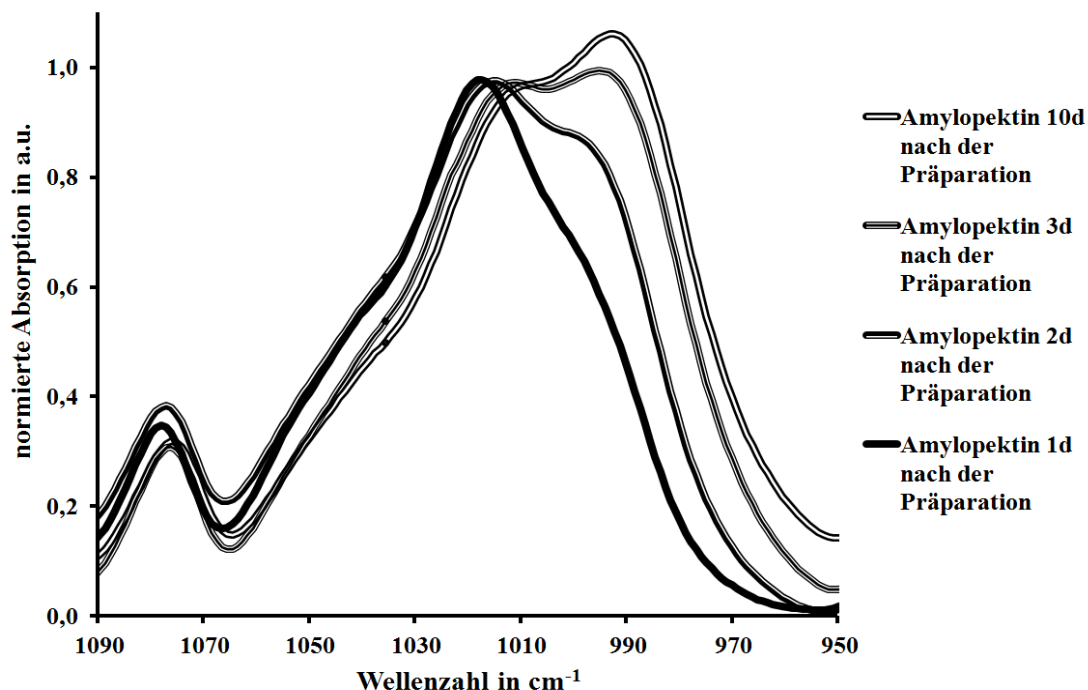


Abb. 164: Zeitabhängige Serie von ATR-FTIR-Spektren des Amylopektingels nach der präparativen Isolierung aus Kartoffelstärke; siehe Abschnitt 3.4.2

Zum Zweck der Analyse der Beeinflussung des Aggregationsprozesses von Cetorelix durch die genannten Stärkekomponenten wird das von LANG, 2005 sowie SCHNEIDER ET AL., 2010 beschriebene Phänomen ausgenutzt, dass innerhalb einer Konzentrationsreihe des GnRH-Antagonisten an einer kritischen Stelle, welche als *cac* (kritische Aggregatbildungskonzentration) bezeichnet wird, eine Veränderung des konzentrationsabhängigen Anstieges der Fluoreszenzemission auftritt. Da die genannte Publikation ausschließlich auf das Verhalten in 10 mM Ammonium-acetat-Lösung (pH 7,0) eingeht, müssen für eine pH-abhängige Untersuchung zunächst analoge Kurven für Cetorelix bei verschiedenen pH-Werten aufgenommen werden. Abb. 165 zeigt diese Fluoreszenzemissionskurven für verschiedene pH-Werte und teilweise verschiedene Inkubationszeiten vor der Messung.

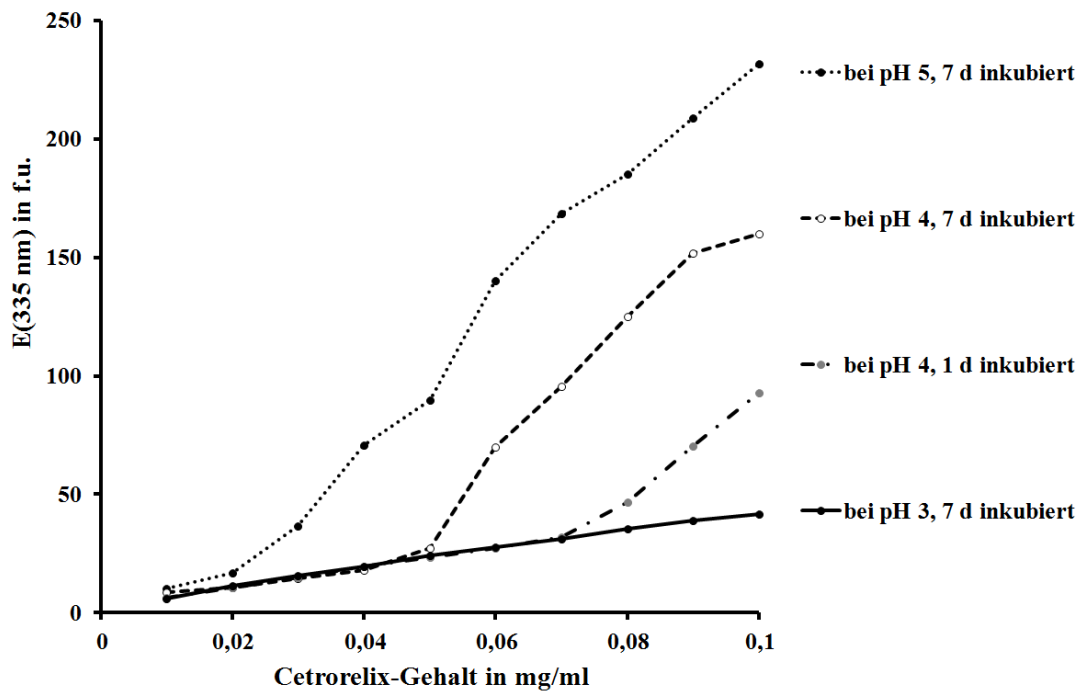


Abb. 165: Konzentrationsabhängige Fluoreszenzemissionsverläufe von Cetorelix-Proben bei verschiedenen pH-Werten und Inkubationszeiten in 0,1 M Ammoniumacetat-Lösung

Um in allen Messreihen ähnliche Ionenstärken zu gewährleisten, werden die pH-Werte durch Ammoniakzugabe zu 0,1 M Essigsäure generiert, was folglich in allen Fällen eine 10-fach erhöhte Ionenstärke im Verhältnis zu den Untersuchungen von SCHNEIDER ET AL., 2010 bedeutet. Für pH-Werte oberhalb von 3,0 wird, wie erwartet, ein bilineares Verhalten beobachtet. Die *cac* verschiebt sich dabei mit steigendem pH-Wert zu immer niedrigeren Cetorelix-Konzentrationen. Bei pH 4,0 verschiebt sich diese kritische Aggregatbildungskonzentration zudem zeitabhängig weiter zu niedrigeren Konzentrationen, was auf einen zumindest mehrere Tage andauernden Prozess hinweist. Bei pH 3,0 wird im untersuchten Bereich keine Abweichung vom linearen Verhalten und daher kein Anzeichen für das Einsetzen einer Aggregation nachgewiesen.

Mit dem Ziel, den Einfluss der Stärkekomponten Amylose und Amylopektin auf diesen Prozess zu untersuchen, werden analoge Konzentrationsreihen des Peptides bei pH 4,0 in Gegenwart von 0,1 mg/ml Amylose bzw. Amylopektin angesetzt und einheitlich nach einem Tag Inkubation unter den genannten Bedingungen fluoreszenzspektroskopisch gemessen. Die resultierenden Kurven sind in Abb. 166 im Vergleich zur polysaccharidfreien Cetorelix-Referenz abgebildet.

Der sichtbar werdende Einfluss beider Komponenten ist drastisch verschieden. Während Amylose die Aggregation zu verstärken scheint, wird der Prozess in Gegenwart von

Amylopektin offenkundig stark gehemmt, sodass im untersuchten Konzentrationsbereich in Analogie zu der zuvor bei pH 3,0 untersuchten Probe gar keine Abweichung vom linearen Verlauf der Emissionskurve auftritt. Daher scheint Amylopektin in gewissen Grenzen die amyloide Aggregation sogar zu inhibieren.

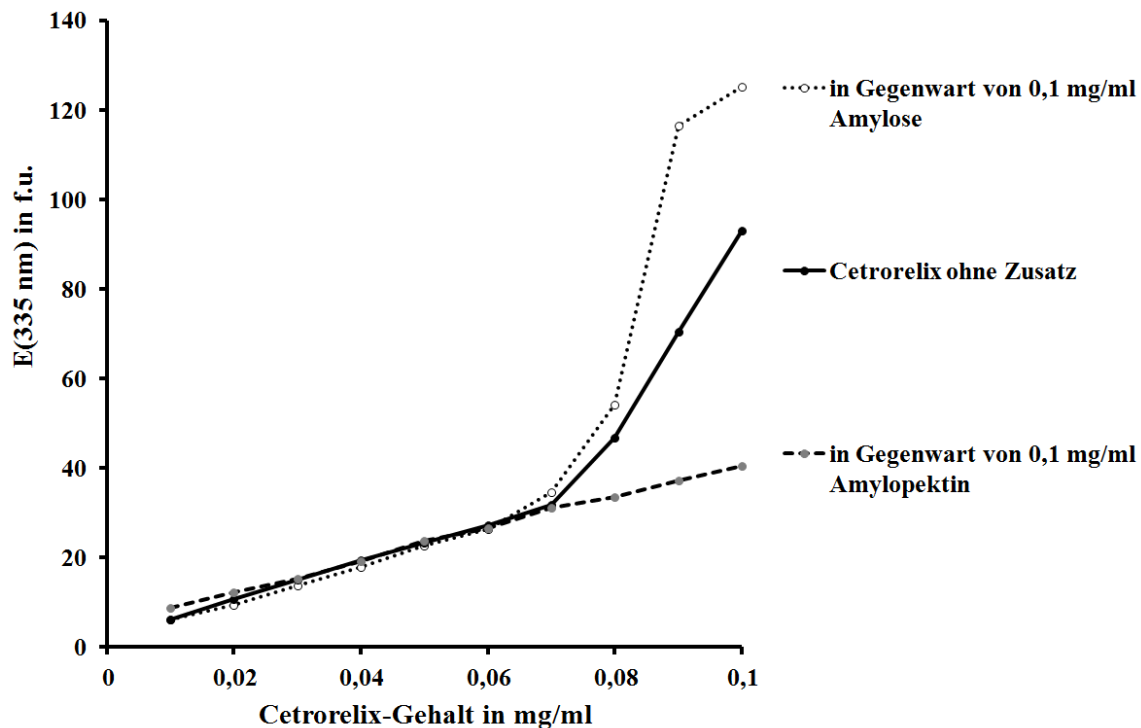


Abb. 166: Konzentrationsabhängige Fluoreszenzemissionsverläufe von Cetorelix-Proben bei pH 4,0 nach eintägiger Inkubation in Gegenwart von Amylose bzw. Amylopektin

4.4.3 Untersuchungen zur Aggregations-inhibierenden Wirkung mithilfe der Kongorottitration

4.4.3.1 Entwicklung der Kongorottitration zur Quantifizierung des Amyloidanteiles von GnRH-Antagonisten

Der Einsatz von Kongorot zum qualitativen und teilweise semi-quantitativen Nachweis amyloider Strukturen ist international etablierte Praxis, wobei in der Regel die charakteristische Veränderung des UV/vis-Absorptionsspektrums der Sonde ausgenutzt wird [vgl. Abschnitt 1.3.2]. Das angesprochene Prinzip findet in dieser Form in der vorliegenden Arbeit bei der Analytik des GHRH-Analogons und seiner Formulierungen mit gewissen Additiven auch Anwendung (vgl. Abschnitt 3.6.4).

Für die untersuchten GnRH-Antagonisten wird jedoch ein spezielles Verhalten in Gegenwart von Kongorot beobachtet. Die Bindung der Sonde an die entsprechenden Peptidaggregate führt nach kurzer Inkubationszeit zu einer Präzipitation, welche die herkömmliche Untersuchung insofern erschwert, als dass bei Resuspendierung zwar die charakteristische Spektrenveränderung der Sonde weiterhin eindeutig nachzuweisen ist, gleichsam jedoch der partikuläre Charakter des Systems zu erheblichen Störungen aufgrund auftretenden Streulichtes führt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit musste deshalb ein neuartiges Verfahren zur Quantifizierung des Amyloid-Gehaltes von GnRH-Antagonisten entwickelt werden. Als Grundlage dient die beobachtete Präzipitation des Peptides in Gegenwart der Sonde Kongorot. Der Effekt ist augenscheinlich darauf zurückzuführen, dass die betrachteten GnRH-Antagonisten unter den Untersuchungsbedingungen kationisch vorliegen, wohingegen die Sonde Kongorot zwei anionische Sulfonsäuregruppen trägt. Die amyloide Aggregation des GnRH-Antagonisten führt zur Ausbildung polykationischer Fibrillen, die in wässrigen Systemen zunächst aufgrund der elektrostatischen Abstoßung eine lyotrope Mesophase bilden und nicht präzipitieren (vgl. Abschnitt 4.1.2). Durch die Bindung der struktur-sensitiven Sonde wird die Ladung oberflächlich kompensiert, was zur Präzipitation führt. Die Bindung der Sonde an den GnRH-Antagonisten erfolgt dabei weiterhin in strikter Abhängigkeit vom amyloiden Charakter und nicht etwa aufgrund elektrostatischer Interaktionen, was anhand des in den Abschnitten 4.1.2.3 und 4.1.2.4 beschriebenen Bindungsverhaltens in Ethanol/Wasser-Gemischen klar ersichtlich ist, da eine solchartige Bindung andernfalls bei Steigerung des Anteiles der organischen Solvenskomponente verstärkt und nicht, wie beobachtet, reduziert werden müsste.

Aus diesen Erkenntnissen folgt die Vermutung, dass sich der Amyloidgehalt von GnRH-Antagonisten auf dem Wege einer Fällungstitration mit Kongorot bestimmen lassen sollte. Dafür wird einer vorgelegten Menge des GnRH-Antagonisten gemäß der Vorschrift in Abschnitt 3.7 schrittweise Kongorot zugesetzt, das jeweils entstehende Präzipitat zentrifugiert und der im Überstand verbleibende Kongorotanteil spektroskopisch ermittelt.

Abb. 167 zeigt auf diesem Wege erhaltene Titrationskurven für den exemplarischen GnRH-Antagonisten Cetrorelix und das nicht amyloid aggregierende Protein Ovalbumin in Abhängigkeit von der vorgelegten Peptidmenge. Bei Betrachtung der erhaltenen Titrationskurven für Ovalbumin im rechten Teil der Abbildung wird deutlich, dass keinerlei Beeinflussung der Absorption des zugesetzten Kongorotes im Überstand in Abhängigkeit von der vorhandenen Proteinmenge erkennbar ist. In Gegenwart des GnRH-Antagonisten

4 Ergebnisse

Cetorelix im linken Teil der Abbildung zeigt sich hingegen ein systematischer Zusammenhang zwischen vorgelegter Peptidmenge und dem Verlauf der korrespondierenden Titrationskurven. Das unter diesen Bedingungen aggregiert vorliegende Cetorelix bindet während der initialen Titrationschritte die zugegebene Sonde quantitativ im Präzipitat, sodass im Überstand anhand der Absorption bei 497 nm kein Kongorot detektiert werden kann. In strenger Proportionalität zur vorgelegten Menge des Peptides wird erst nach Überschreiten einer bestimmten, hinzutitrierten Quantität an Kongorot ein Anstieg der Absorption bei 497 nm im Überstand verzeichnet. Nach Überschreiten dieses Äquivalenzpunktes führt jede weitere Kongorotzugabe zu einem linearen Anstieg der gemessenen Absorption, was zu der Interpretation führt, dass die vorhandenen Bindungsplätze auf der amyloiden Oberfläche des Peptidaggregates an dieser Stelle erschöpft sind und somit keine Bindung zusätzlicher Sondenmoleküle mehr erfolgen kann.

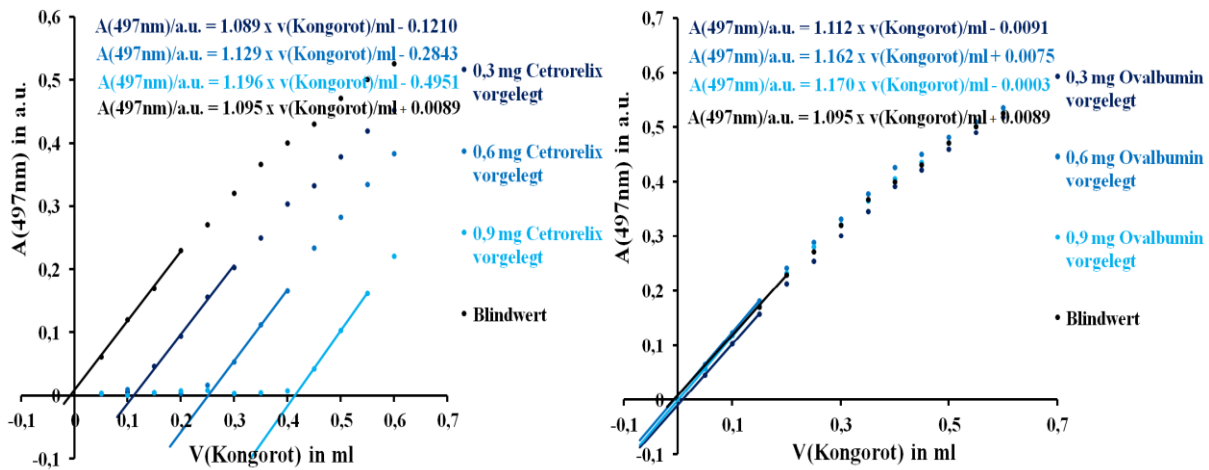


Abb. 167: Kongorottitration von Proben des amyloid aggregierten GnRH-Antagonisten Cetorelix (links) und des nicht amyloid aggregierenden Proteins Ovalbumin (rechts) in Abhängigkeit von der vorgelegten Menge des jeweiligen Analyten samt Extrapolationsgeraden zur Nullstellenbestimmung

Aus dem Experiment geht folglich hervor, dass Cetorelix eine konkrete spezifische Kongorotbindungskapazität $\frac{n_{CR}}{n_{Cx}}$ besitzt, welche aus den titrierten Werten nach Gl. 8 berechnet werden kann.

$$\frac{n_{CR}}{n_{Cx}} = \frac{v_{CR} \cdot c_{CR} \cdot M_{Cx}}{m_{Cx} \cdot M_{CR}} \quad (\text{Gl. 8})$$

mit v_{CR} titriertes Volumen an Kongorot in ml
 c_{CR} Konzentration der Kongorot-Stammlösung in mg/ml
 m_{Cx} vorgelegte Cetorelix-Masse in mg

Das Experiment lässt sich in analoger Weise auch für Teverelix und Ozarelix durchführen. Die korrespondierenden Titrationskurven sind auf der Anhang-DVD unter "Kongorot-titrations/Bindungskapazität_der_GnRH-Antagonisten" abgelegt.

Die erhaltenen Titrationswerte und daraus berechneten Kongorotbindungskapazitäten sind in Tabelle 33 zusammengestellt.

Tabelle 33: Übersicht der mittels Kongorottitration bestimmten Äquivalenzpunkte und Kongorotbindungskapazitäten der GnRH-Antagonisten Cetrorelix, Ozarelix und Teverelix

GnRH-Antagonist	vorgelegte Peptidmasse	titriertes Volumen an Kongorotlösung bezogen auf 0,9 mg Peptid	Mittelwert und Standardabweichung des titrierten Volumens bezogen auf 0,9 mg Peptid	Kongorot-bindungskapazität
Cetrorelix	0,3 mg	(0,4012 ± 0,0320) ml	(0,3922 ± 0,0110) ml	0,895 ± 0,025
	0,6 mg	(0,3800 ± 0,0021) ml		
	0,9 mg	(0,3954 ± 0,0262) ml		
Ozarelix	0,3 mg	(0,2963 ± 0,0150) ml	(0,2896 ± 0,0066) ml	0,674 ± 0,015
	0,6 mg	(0,2831 ± 0,0254) ml		
	0,9 mg	(0,2895 ± 0,0202) ml		
Teverelix	0,3 mg	(0,3987 ± 0,0335) ml	(0,3902 ± 0,0122) ml	0,908 ± 0,028
	0,6 mg	(0,3762 ± 0,0019) ml		
	0,9 mg	(0,3956 ± 0,0275) ml		

Aus der Zusammenstellung der bestimmten Kongorotbindungskapazitäten geht hervor, dass zwischen Cetrorelix und Teverelix keine signifikanten Unterschiede bestehen, wohingegen Ozarelix-Aggregate etwa ein Drittel weniger Kongorot binden. Dieses Resultat korreliert mit den in Abschnitt 4.1.1.2 dargestellten Ergebnissen zum infrarotspektroskopisch bestimmten β -Faltblattgehalt der drei GnRH-Antagonisten und bestätigt daher, dass der Amyloidgehalt von Ozarelix-Aggregaten systematisch geringer ist, als derjenige von Cetrorelix- oder Teverelixaggregaten.

4.4.3.2 Kongorottitration von Cetrorelix in Gegenwart von Poly-L-Glutamat und der Gallotanninmischung in Abhängigkeit von den Formulierungsbedingungen

Das im vorhergehenden Abschnitt erläuterte Titrationsverfahren bietet eine Möglichkeit, den Einfluss eines Komplexpartners bzw. Additivs auf den Amyloidgehalt von GnRH-Antagonisten quantifizieren zu können. Zu diesem Zweck wird die Titration einer konstanten Menge des GnRH-Antagonisten in Gegenwart systematisch variiert Mengen des Komplexpartners bzw. Additivs mehrfach wiederholt und dabei jeweils die prozentuale Veränderung des Amyloidgehaltes erfasst.

In Abb. 168 ist der veränderte Amyloidgehalt von Cetrorelix anhand des mittels Titration bestimmten Kongorotbindungsplatzverlustes in Komplexen mit Poly-L-Glutamat in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge des Komplexpartners aufgetragen. Die resultierende Kurve zeigt ein Sättigungsverhalten. Während im Bereich verhältnismäßig geringer Poly-L-Glutamat/Cetrorelix-Massenverhältnisse eine starke Abhängigkeit zwischen der zugesetzten Menge an Poly-L-Glutamat und dem titrierten Kongorotbindungsplatzverlust besteht, nähert sich die Kurve für höhere Massenverhältnisse asymptotisch einem Wert von ca. 50 % an. Der darüber hinaus vorhandene Amyloidgehalt von Cetrorelix kann daher offensichtlich durch dieses Partnermolekül nicht beeinflusst werden.

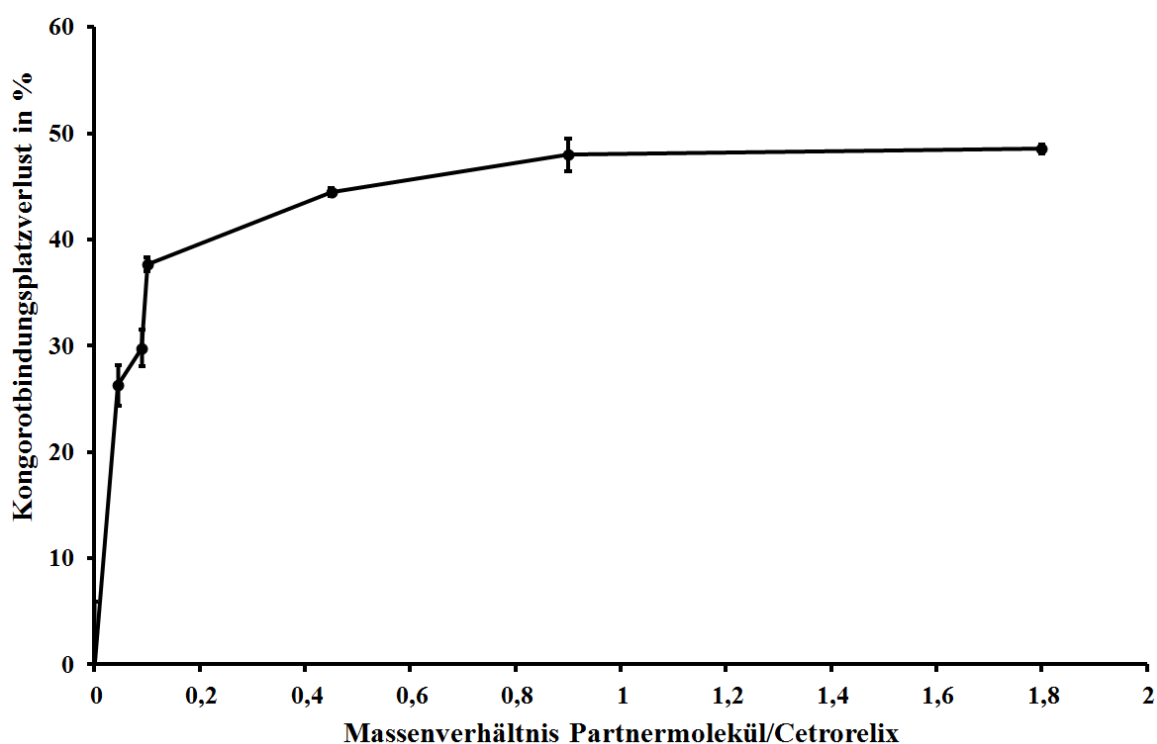


Abb. 168: Kongorotbindungsplatzverlust in Cetrorelix-Poly-L-Glutamat-Komplexen in Korrelation zum Massenverhältnis zwischen Poly-L-Glutamat und Cetrorelix im Präparationsansatz

Wird die ungetrennte Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* als Partnermolekül betrachtet, so müssen die in Abschnitt 4.4.1.2 herausgearbeiteten Unterschiede der resultierenden Komplexe in Abhängigkeit von den Präparationsbedingungen berücksichtigt werden. Da anhand von ATR-FTIR-Spektren im genannten Abschnitt zu sehen ist, dass der Aggregationszustand von Cetrorelix in solchen Komplexen insbesondere dann markant geringer ausfällt, wenn beide Komplexpartner zunächst bei pH 3,0 vereinigt und erst nach einer adäquaten Interaktionsphase bei diesem pH-Wert auf pH 7,0 eingestellt werden, als

wenn die Einstellung auf pH 7,0 schon vor der Vereinigung beider Komponenten vorgenommen wird, werden diese beiden Präparationswege auch im Rahmen der Kongorottitration separat untersucht. Die jeweils resultierenden Titrationskurven sind in Abb. 169 einander gegenüber gestellt.

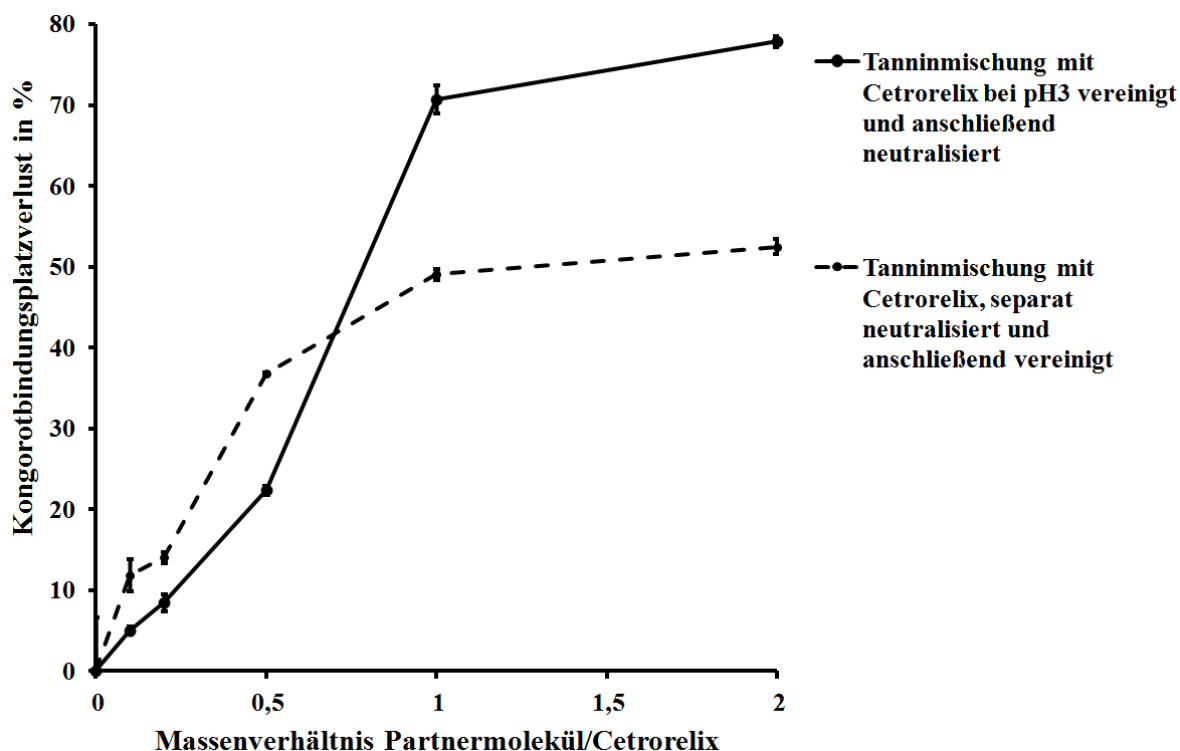


Abb. 169: Kongorotbindungsplatzverlust in Cetorelix-Komplexen mit der ungetrennten Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* in Korrelation zum Massenverhältnis zwischen Partnermolekül und Cetorelix für zwei unterschiedliche Präparationsvarianten

Ein Vergleich der beiden Sättigungskurven bringt erhebliche Unterschiede zwischen den erhaltenen Komplexen zu Tage. Während im Fall der Vereinigung der separat neutralisierten Komplexkomponenten eine asymptotische Annäherung auf einen Maximalwert von nur knapp über 50 % zu beobachten ist, ist der Amyloidgehalt in solchen Komplexen, bei denen die beiden Komplexpartner erst nach einer Interaktionsphase bei pH 3,0 auf pH 7,0 eingestellt werden, für hohe Massenverhältnisse zwischen der Gallotanninmischung und Cetorelix um mehr als 75 % reduziert und die Sättigungskurve weist auch für die höchste untersuchte Tanninmenge noch eine markante Steigung auf.

Entsprechende Kongorottitrationen werden ebenfalls für alle anderen in Abschnitt 4.4.1.2 bereits mithilfe der ATR-FTIR-Spektroskopie analysierten Präparationsvarianten der Komplexe aus Cetorelix und der Gallotanninmischung sowie der Dreikomponenten-

komplexe dieser Komponenten mit Poly-L-Glutamat durchgeführt. Abb. 170 gibt jeweils den bei hohem Massenverhältnis zu Cetorelix ermittelten Maximalwert für den Kongorotbindungsplatzverlust an.

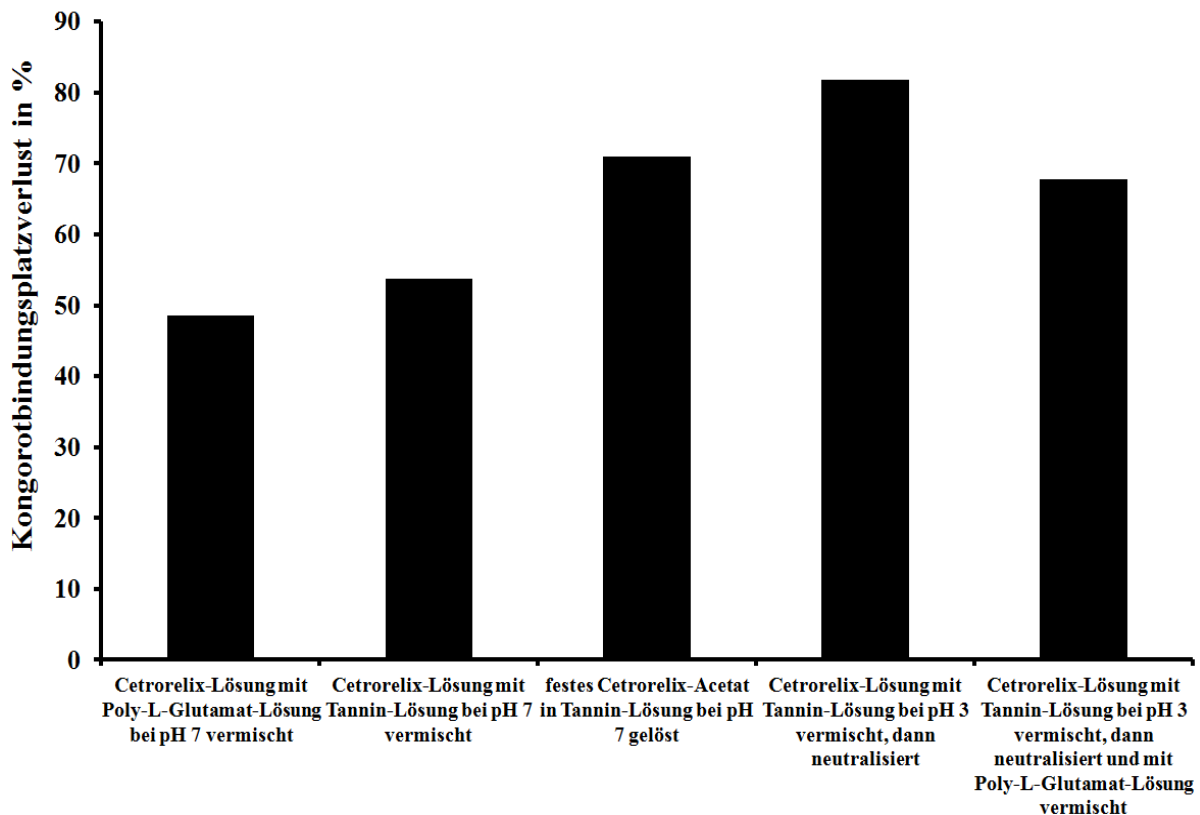


Abb. 170: Maximal ermittelter Kongorotbindungsplatzverlust für Cetorelix-Komplexe mit der Gallotanninmischung und Poly-L-Glutamat in Abhängigkeit von der Präparationsvariante

Es wird deutlich, dass die Gallotanninmischung grundsätzlich einen stärkeren Einfluss auf den Amyloidgehalt von Cetorelix nimmt als Poly-L-Glutamat und ein zusätzlicher Einsatz letztgenannter Komponente die Wirkung der Gallotanninmischung auch nicht positiv zu erweitern vermag. Darüber hinaus wird der Amyloidgehalt des GnRH-Antagonisten stärker reduziert, wenn das Peptid aus dem festen Lyophilisat direkt in einer tanninhaltigen Lösung aufgenommen wird, als wenn die Gallotanninmischung erst nachträglich zu einer bereits bestehenden Lösung des GnRH-Antagonisten bei pH 7,0 hinzugefügt wird, wobei der Effekt maximiert wird, wenn beide Komponenten zunächst einer Interaktionsphase bei pH 3,0 unterzogen werden.

Aufgrund dieser Erkenntnis werden alle folgenden Kongorottitrationen an Tanninfraktionen nach einer entsprechenden Interaktionsphase bei pH 3,0 vorgenommen, um den jeweils maximal erreichbaren Effekt abbilden und vergleichen zu können.

4.4.3.3 Kongorottitration von Cetrorelix in Gegenwart von Teilfraktionen der Tanninfraktionen TaF1 - TaF4

Im linken Teil von Abb. 171 ist der prozentuale Verlust an Kongorotbindungsplätzen für Cetrorelix-Komplexe mit Tanninfraktion TaF1 und deren auf dem Wege semi-präparativer HPLC gewonnenen Teilfraktionen gegen das Massenverhältnis zwischen Tanninkomponente und Cetrorelix aufgetragen. Alle drei dargestellten Kurven weisen auch bei dem höchsten untersuchten Massenverhältnis von 3 : 1 einen deutlichen Anstieg auf, sodass hierbei noch kein Plateau erreicht werden konnte. Der maximal erzielte Bindungsplatzverlust und damit einhergehend die maximale Reduktion des Amyloidgehaltes von Cetrorelix beträgt für Tanninfraktion TaF1 und deren Teilfraktion TaF1_Peak1 ca. 60 %, wohingegen der Einsatz der Teilfraktion TaF1_Peak2 eine signifikant stärkere Wirkung entfaltet und in diesem Fall der Amyloidgehalt sogar um ca. 85 % gesenkt werden kann.

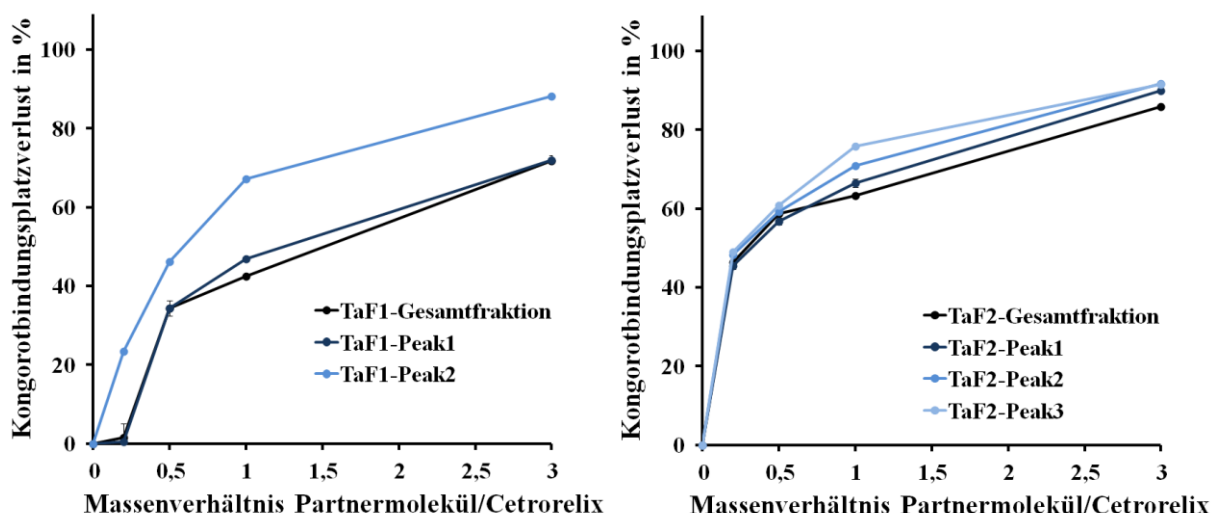


Abb. 171: Kongorottitrationen für Cetrorelix-Komplexe mit Tanninfraktion TaF1 und deren Teilfraktionen (links) sowie mit Tanninfraktion TaF2 und deren Teilfraktionen (rechts)

Im rechten Teil von Abb. 171 sind die korrespondierenden Kurven für Tanninfraktion TaF2 und ihre Teilfraktionen als Komplexpartner veranschaulicht. Bezüglich der Wirkung unterscheiden sich diese Teilfraktionen nicht signifikant voneinander. Maximal wird eine Reduktion des Amyloidgehaltes des Peptides zwischen 80 und 85 % realisiert.

Bei näherer Betrachtung der in Abb. 172 abgebildeten Resultate für Cetrorelix-Komplexe mit den Teilfraktionen der Tanninfraktionen TaF3 und TaF4 fällt auf, dass in diesen Fällen oberhalb eines Massenverhältnisses von 1 : 1 zwischen Partnermolekül und Peptid ein Plateau erreicht wird und damit der deaggregierende Effekt durch weitere Partnermolekülzugabe nicht mehr relevant zu steigern ist. Gleichzeitig ist in diesen Fällen zu konstatieren, dass der

Amyloidgehalt von Cetrorelix bei Erreichen des Plateaus bereits um mehr als 90 % reduziert ist, was dafür spricht, dass es sich bei den enthaltenen Tanninspezies um äußerst effektive Inhibitoren des Aggregationsprozesses handelt.

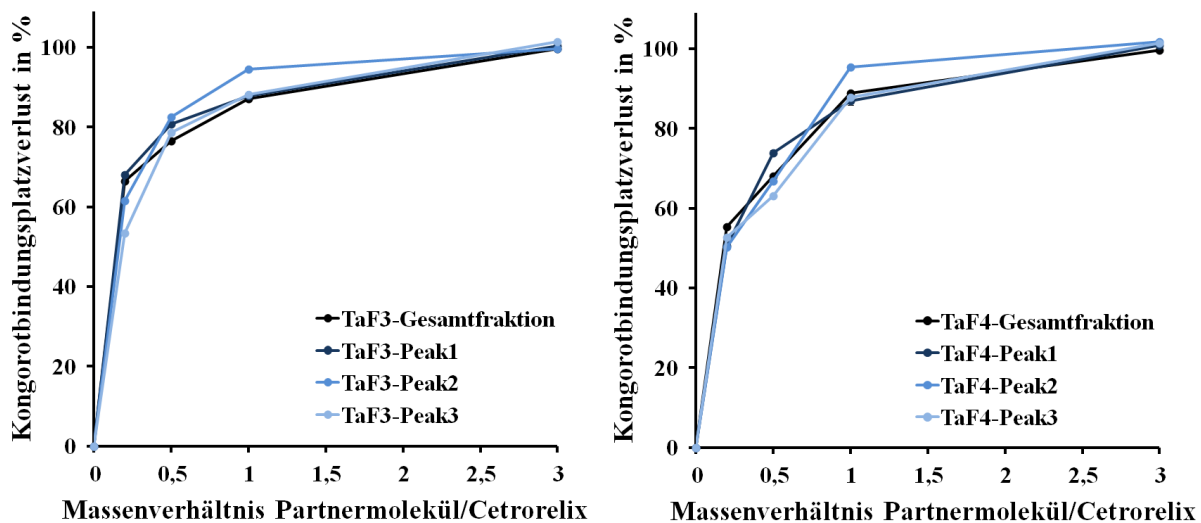


Abb. 172: Kongorotitrationen für Cetrorelix-Komplexe mit Tanninfraktion TaF3 und deren Teilfraktionen (links) sowie mit Tanninfraktion TaF4 und deren Teilfraktionen (rechts)

4.4.3.4 Kongorotitation von Ozarelix in Gegenwart von Teilfraktionen der Tanninfraktionen TaF1 - TaF4

Für den GnRH-Antagonisten Ozarelix werden bereits in Komplexen mit den Teilfraktionen der Tanninfraktionen TaF1 und TaF2 Verringerungen des Amyloidgehaltes von mehr als 90 % realisiert, wie in Abb. 173 klar zu erkennen ist. Dieses Verhalten unterscheidet sich daher erheblich von demjenigen, welches für Cetrorelix in Abb. 171 zu beobachten ist, und deutet darauf hin, dass die Reduktion des Amyloidgehaltes im Falle von Ozarelix bereits durch weniger effektive Inhibitoren zu erreichen ist.

Diese Vermutung bestätigt sich anhand der korrespondierenden Untersuchungen an den Komplexen mit Teilfraktionen der Tanninfraktionen TaF3 und TaF4. Die entsprechenden Resultate sind in Abb. 174 visualisiert. In allen Messreihen der Abbildung kann oberhalb eines Massenverhältnisses von 1 : 1 zwischen Tanninfraktion und Ozarelix kein Amyloidanteil in den Proben mehr nachgewiesen werden, was folglich zur Bildung eines Plateaus bei 100 % Kongorotbindungsplatzverlust führt.

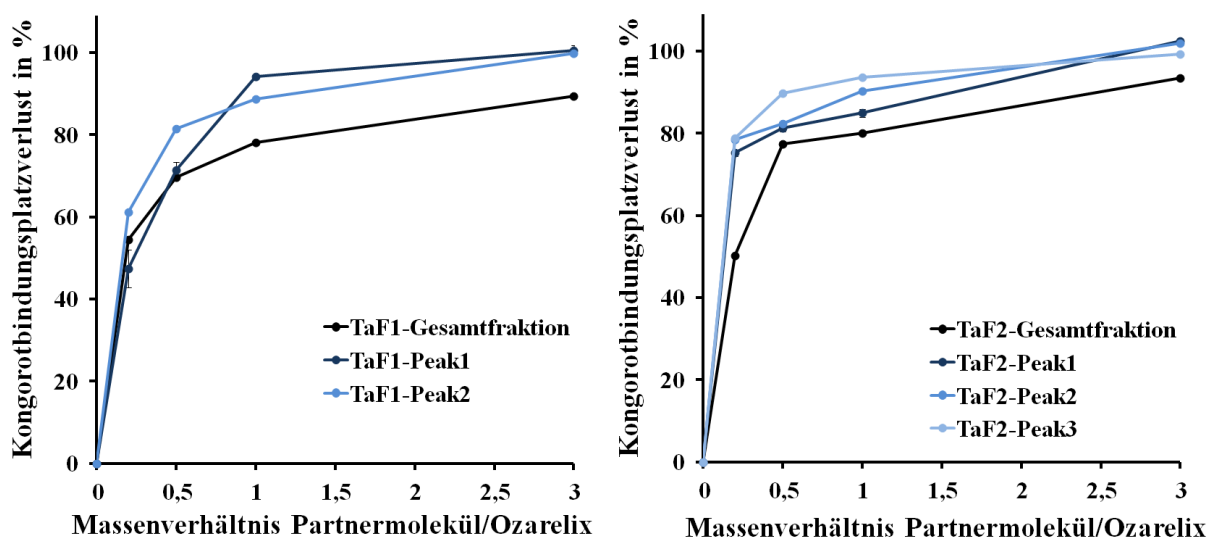


Abb. 173: Kongorotitrationen für Ozarelix-Komplexe mit Tanninfraktion TaF1 und deren Teilfraktionen (links) sowie mit Tanninfraktion TaF2 und deren Teilfraktionen (rechts)

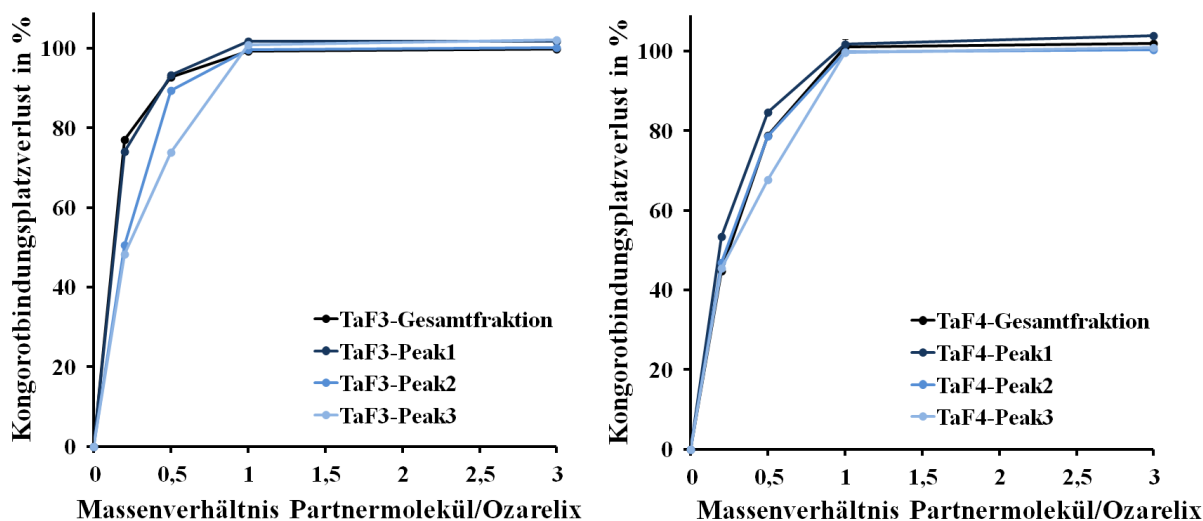


Abb. 174: Kongorotitrationen für Ozarelix-Komplexe mit Tanninfraktion TaF3 und deren Teilfraktionen (links) sowie mit Tanninfraktion TaF4 und deren Teilfraktionen (rechts)

4.4.3.5 Kongorotitration von Teverelix in Gegenwart von Teilfraktionen der Tanninfraktionen TaF1 - TaF4

Der Verlust an Kongorotbindungsplätzen in Komplexen von Teverelix mit Tanninfraktion TaF1 und ihren Teilfraktionen ist im linken Teil von Abb. 175 zu sehen. Dabei ist der Verlauf der bestimmten Kurve für Tanninfraktion TaF1 nahezu deckungsgleich mit dem Verlauf für den Teverelix-Komplex mit der Teilfraktion TaF1_Peak1, wobei eine maximale Reduktion des Amyloidgehaltes von ca. 60 % erzielt wird. Die Teilfraktion TaF1_Peak2 erweist sich im

Vergleich dazu als effektiverer Inhibitor der Aggregation des Peptides und ermöglicht eine über 90 %ige Verringerung der Amyloidbildung. Demzufolge korrelieren diese Resultate stark mit denen, die für Cetrorelix erhalten werden.

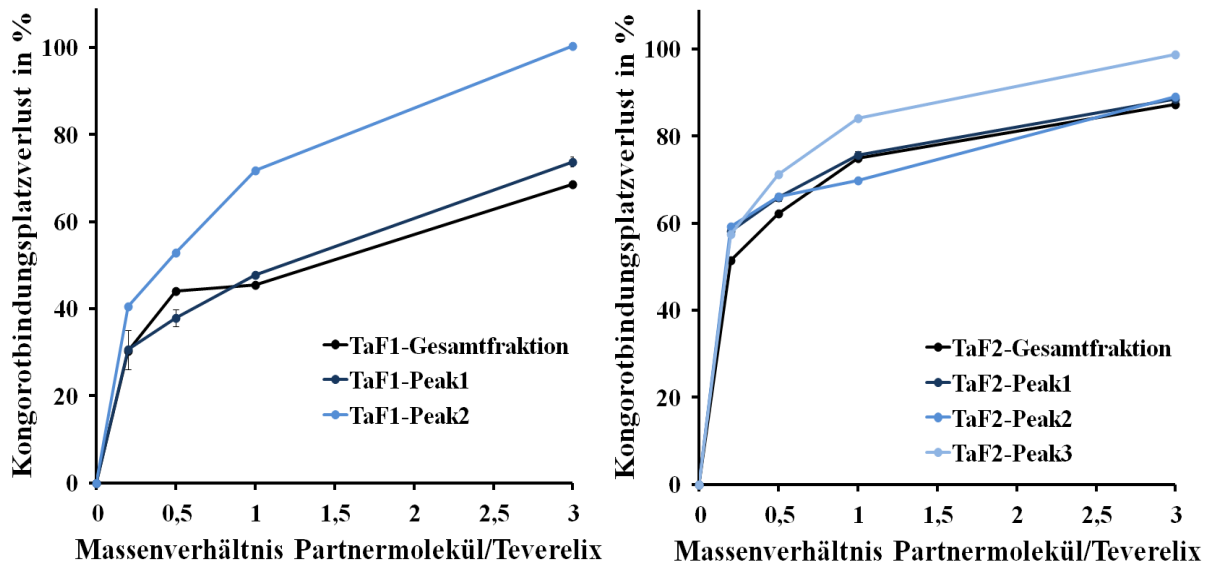


Abb. 175: Kongorottitrationskurven für Teverelix-Komplexe mit Tanninfraktion TaF1 und deren Teilfraktionen (links) sowie mit Tanninfraktion TaF2 und deren Teilfraktionen (rechts)

Auch die im rechten Teil von Abb. 175 dargestellten Kurven für Tanninfraktion TaF2 und deren Teilfraktionen als Komplexpartner für Teverelix ähneln den für Cetrorelix ermittelten Kurven. Die maximale Reduktion des Amyloidgehaltes beträgt in diesem Fall zwischen 80 und 85 %. Anhand von Abb. 176 wird darüber hinaus deutlich, dass auch in diesem Fall die Tanninfraktionen TaF3 und TaF4 und ihre jeweiligen Teilfraktionen die effektivsten Aggregationsinhibitoren repräsentieren

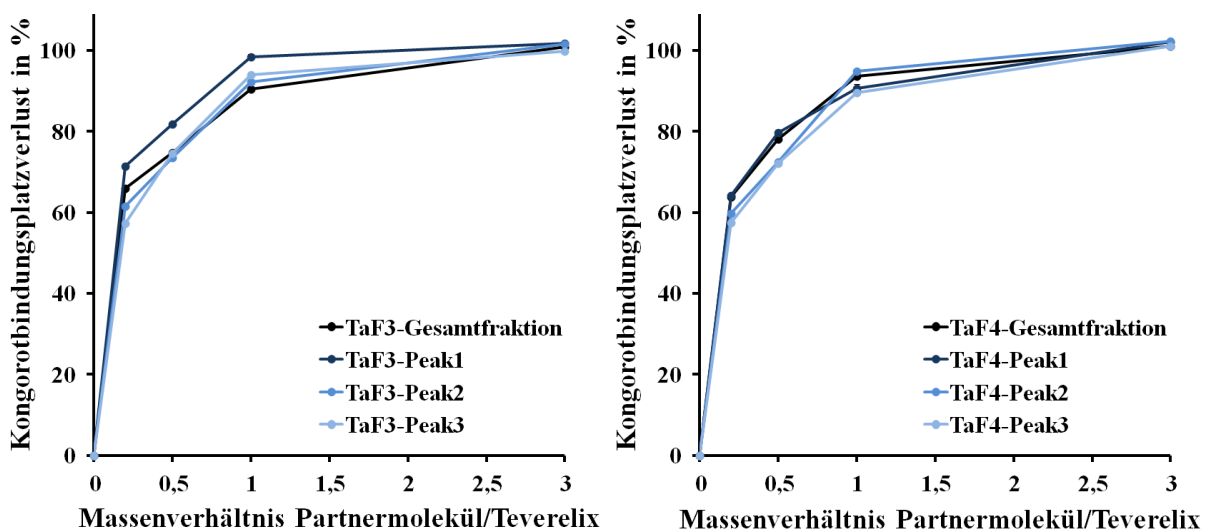


Abb. 176: Kongorottitrationskurven für Teverelix-Komplexe mit Tanninfraktion TaF3 und deren Teilfraktionen (links) sowie mit Tanninfraktion TaF4 und deren Teilfraktionen (rechts)

4.4.3.6 Kongorottitation von GnRH-Antagonisten in Gegenwart der methanolytisch gewonnenen finalen Tanninspezies

Die Trigalloylglukose 3GG, die Tetragalloylglukose 4GG und die Pentagalloylglukose PGG stellen die einzigen niedermolekularen Reinsubstanzen dar, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit neben reiner Gallussäure als potentielle Aggregationsinhibitoren für GnRH-Antagonisten isoliert und untersucht werden. Gallussäure selbst bewirkt allerdings keinerlei messbare Verringerung des Amyloidgehaltes von Cetrorelix und Ozarelix, weshalb auf eine explizite Darstellung der entsprechenden Kurven verzichtet wird. Die diesbezügliche Wirkungslosigkeit von Gallussäure wurde im Rahmen einer besonderen Lernleistung von E. Jankowski auch für den GnRH-Antagonisten Teverelix bestätigt.

In Abb. 177 sind die mittels Kongorottitation ermittelten Werte für die Reduktion des Amyloidgehaltes in Komplexen von Cetrorelix und Teverelix mit 3GG, 4GG und PGG dargestellt. Für beide Peptide werden ähnliche Kurvenverläufe erhalten, aus denen hervorgeht, dass die erzielte Reduktion des Amyloidgehaltes mit steigender Galloylierung des verwendeten Partnermoleküls zunimmt und im Falle von PGG eine Reduktion der Peptidaggregation von über 95 % möglich ist.

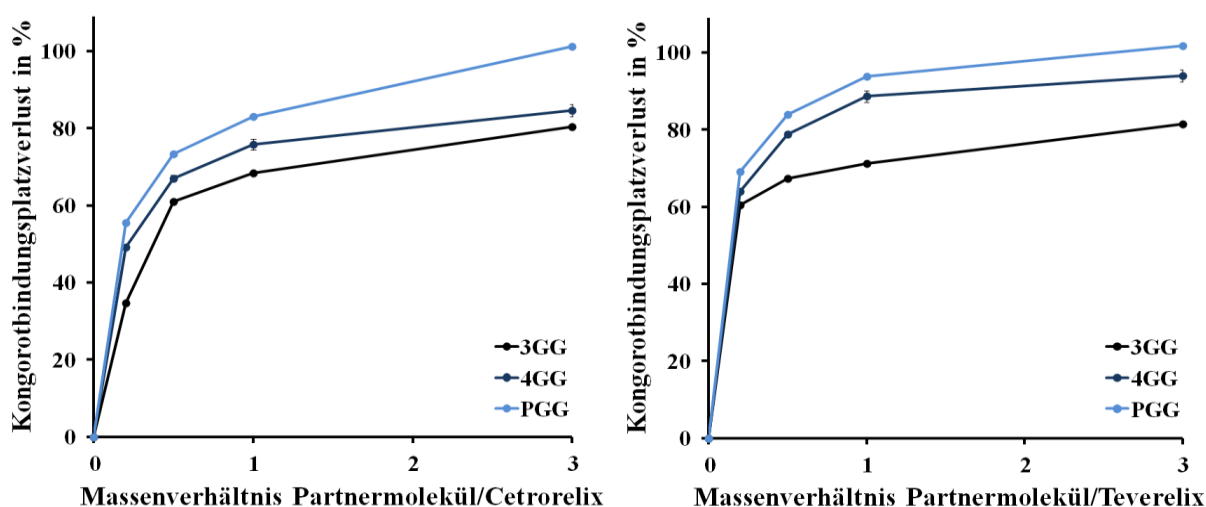


Abb. 177: Kongorottitationskurven für Cetrorelix-Komplexe (links) bzw. Teverelix-Komplexe (rechts) mit den finalen Tanninspezies 3GG, 4GG und PGG aus der Methanolyse der Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis*

Die analogen Ergebnisse für den GnRH-Antagonisten Ozarelix sind Abb. 178 zu entnehmen. Wie schon in den vorhergehenden Abschnitten für die chromatographisch getrennten Tanninfraktionen beobachtet, weicht das Verhalten von Ozarelix von den beiden anderen GnRH-Antagonisten insofern ab, als dass der Amyloidgehalt in diesem Fall schon durch

weniger effektive Inhibitoren stark reduziert werden kann. Für alle drei Tanninspezies ist der Amyloidgehalt von Ozarelix schon bei einem Massenverhältnis von 0,2 : 1 zwischen Tanninspezies und Peptid um mehr als 85 % verringert, wodurch keine signifikante Wirkungsabstufung zwischen den untersuchten Tanninspezies erkennbar ist. Bei Massenverhältnissen oberhalb von 1 : 1 ist kaum noch eine Amyloidbildung nachweisbar.

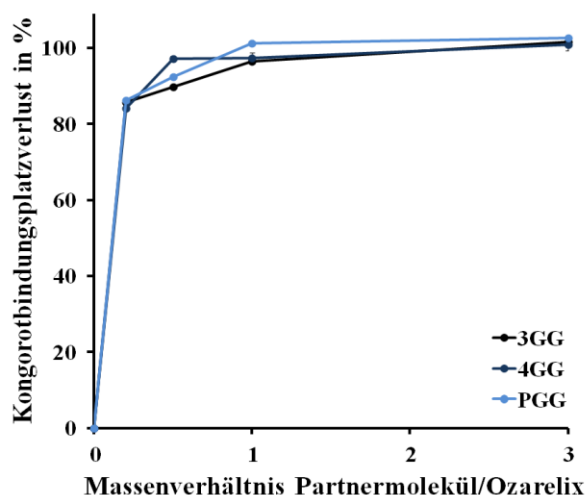


Abb. 178: Kongorottitrationskurven für Ozarelix-Komplexe mit den finalen Tanninspezies 3GG, 4GG und PGG aus der Methanolyse der Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis*

4.4.4 Untersuchungen zur Selektivität der Interaktion von Cetorelix mit Tanninspezies

4.4.4.1 Interaktionsstudien mit den Tanninfraktionen TaF1 und TaF2

Um zu untersuchen, inwieweit bei der Komplexbildung von Cetorelix mit den Tanninfraktionen TaF1 und TaF2 einzelne Tanninspezies selektiv bevorzugt interagieren, wird Cetorelix gemäß Abschnitt 3.16.1 mit der jeweiligen Tanninfraktion in einem Massenverhältnis von 1 : 2 komplexiert, sodass Tannin im Ansatz im Überschuss vorliegt. Mithilfe von LC-MS/MS-Analysen der verbleibenden Überstände können die im Komplex gebundenen Tanninspezies indirekt erfasst werden.

Abb. 179 zeigt die Chromatogramme der Hauptkomponenten von TaF1 im Überstand einer solchen Interaktionsprobe im Vergleich zu einer peptidfreien Referenz. Es ist augenfällig, dass diejenigen Tanninspezies mit dem höchsten Galloylierungsgrad (4GG) nach der Interaktion im Überstand kaum mehr nachweisbar sind und folglich bevorzugt mit Cetorelix interagiert haben müssen. Die niedriger galloylierten Spezies treten jedoch im gleichen Muster wie in der Referenz auf, sodass für diese Verbindungen eine schwächere Interaktionstendenz zu konstatieren ist.

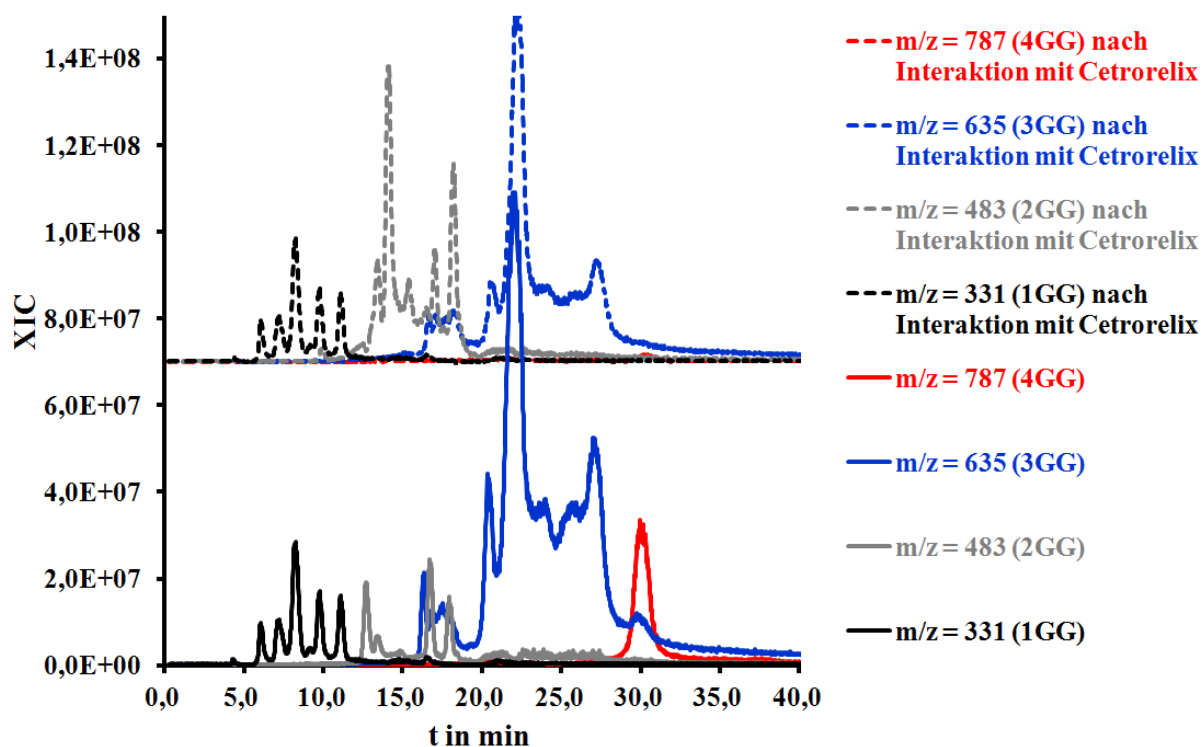


Abb. 179: LC-MS-Chromatogramme der Hauptkomponenten von Tanninfraktion TaF1 nach Interaktion mit Cetorelix (oben) bzw. in einer peptidfreien Referenz (unten)

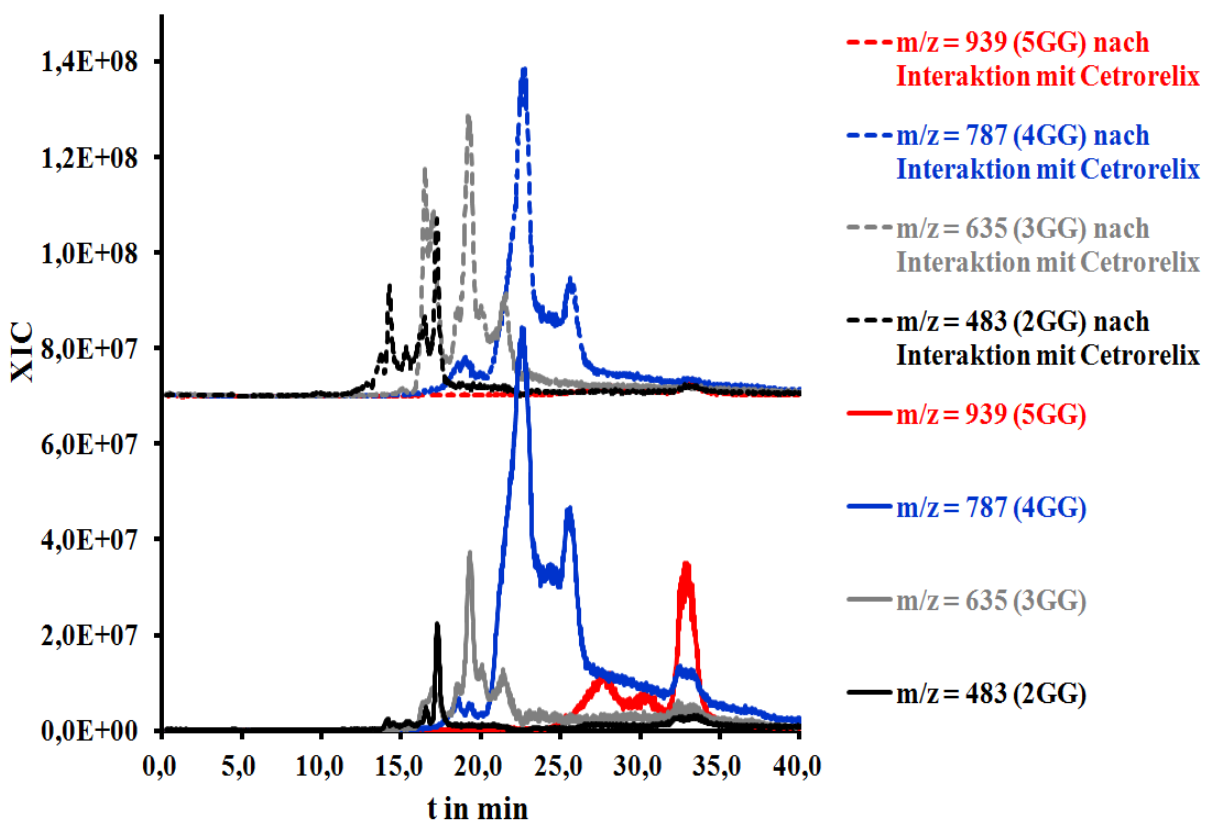


Abb. 180: LC-MS-Chromatogramme der Hauptkomponenten von Tanninfraktion TaF2 nach Interaktion mit Cetorelix (oben) bzw. in einer peptidfreien Referenz (unten)

Abb. 180 zeigt die korrespondierenden Chromatogramme für die Versuchsdurchführung mit Tanninfraktion TaF2. In diesem Fall werden bei der Komplexbildung mit Cetrorelix die 5GG-Spezies annähernd vollständig aus dem Überstand entfernt, was wiederum dafür spricht, dass bevorzugt hochgalloylierte Spezies gebunden werden.

4.4.4.2 Interaktionsstudien mit Methanolyseprodukten

Im Rahmen eines Forschungspraktikums führte B.Sc. P. Körner Experimente zur Selektivität der Interaktion zwischen Methanolyseprodukten und dem GnRH-Antagonisten Cetrorelix durch, deren zentrale Ergebnisse an dieser Stelle kurz dargestellt werden sollen.

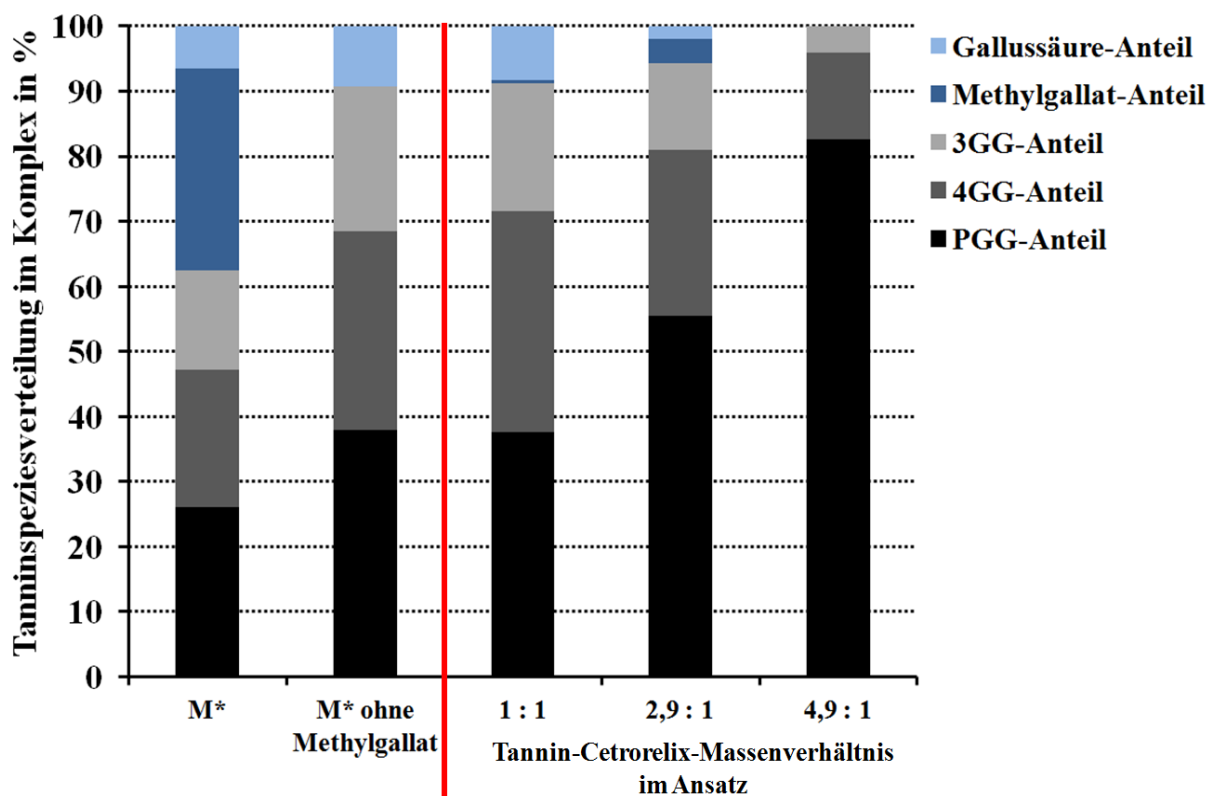


Abb. 181: Relative Zusammensetzung der Tanninspezies im Komplex mit Cetrorelix in Abhängigkeit vom Massenverhältnis beider Komponenten im Ansatz; auf der linken Seite der roten Trennlinie sind zum Vergleich die Zusammensetzung der eingesetzten Methanolyseproduktmischung (M*) mit und ohne Berücksichtigung von Methylgallat angegeben

Wie in Abschnitt 4.3.2 dargelegt, verbleibt nach methanolytischer Spaltung der Depsidbindungen der verwendeten Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* eine übersichtliche Mischung mit den Hauptkomponenten Gallussäure, Methylgallat, 1,2,6-O-

Trigalloyl- β -D-Glukose (3GG), 1,2,3,6-O-Tetragalloyl- β -D-Glukose (4GG) und 1,2,3,4,6-O-Pentagalloyl- β -D-Glukose (PGG). Wird diese Methanolyseproduktmischung (M*) mit Cetrorelix bei pH 7,0 in unterschiedlichen Massenverhältnissen vereinigt, tritt eine Komplexbildung samt Präzipitation auf. Durch Quantifizierung der nicht gefällten Tanninspezies im Überstand mittels HPLC lässt sich indirekt die Zusammensetzung der Tanninspezies im entsprechenden Komplex bestimmen.

Abb. 181 stellt die so ermittelten Zusammensetzungen der interagierenden Tanninspezies in Abhängigkeit vom Tannin-Cetrorelix-Massenverhältnis im Ansatz dar. Zum Vergleich ist weiterhin die relative Zusammensetzung der eingesetzten Methanolyseproduktmischung unter Berücksichtigung bzw. Ausschluss von Methylgallat abgebildet.

Betrachtet man zunächst die Zusammensetzung der Tanninspezies im Komplex mit Cetrorelix bei einem Ansatzverhältnis von 1 : 1 in Relation zur Methanolyseproduktmischung, dann wird deutlich, dass die Zusammensetzung mit derjenigen der eingesetzten Mischung übereinstimmt, wenn der Methylgallatgehalt der Mischung herausgerechnet wird. Offensichtlich interagiert Methylgallat nicht mit dem GnRH-Antagonisten. Für die anderen Spezies besteht unter diesen Bedingungen jedoch keine Präferenz. Betrachtet man das Verhalten bei sukzessiver Erhöhung des Massenanteils an Methanolyseprodukten gegenüber Cetrorelix, ist klar ersichtlich, dass PGG einen immer größeren Anteil im Komplex einnimmt und insoweit bevorzugt mit dem Peptid interagiert.

4.5 Untersuchungen zum Freisetungsverhalten der generierten Komplexe mithilfe der Dialyseliberationsapparatur

4.5.1 Evaluierung der entwickelten Dialyseliberationsapparatur

4.5.1.1 Charakterisierung der entwickelten Dialyseliberationsapparatur mithilfe der niedermolekularen Modellschubstanz Tyrosin

Die in Abschnitt 3.20.1 im Detail beschriebene Dialyseliberationszelle stellt eine eigens für die vorliegende Arbeit entwickelte Analysenapparatur dar und verlangt daher eine intensive Evaluierung der Aussagekraft und Reproduzierbarkeit der damit ermittelten Ergebnisse. Um grundlegende Charakteristika der Apparatur zu untersuchen, werden Versuchsreihen mit der Modellschubstanz Tyrosin durchgeführt. Für Detailinformationen zur Durchführung aller in diesem und den anschließenden Abschnitten erläuterten Experimenten sei auf Abschnitt 3.20 verwiesen.

Abb. 182 zeigt die prozentuale Freisetzung an Tyrosin in das äußere Liberaionsgefäß bei pH 3,0 über einen Zeitraum von 7 Tagen. Unabhängig von der absolut vorgelegten Tyrosinkonzentration werden nahezu deckungsgleiche Kurvenverläufe mit einem stetig abnehmenden Anstieg für die prozentuale Freisetzung der Aminosäure beobachtet, wie es für einen solchen osmotischen Prozess auch zu erwarten ist.

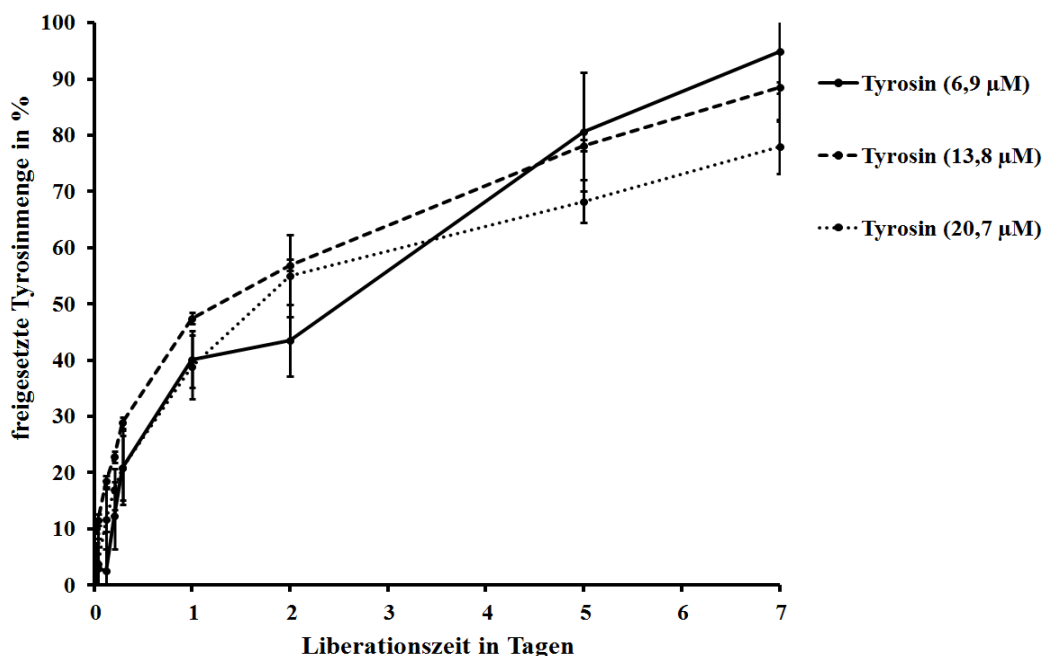


Abb. 182: Dialyseliberationskurven für Tyrosinlösungen variiertter Konzentration bei pH 3,0 über einen Gesamtzeitraum von 7 Tagen (Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen)

In der Auftragung in Abb. 182 wird, wie in allen folgenden Dialyseliberationskurven, berücksichtigt, dass selbst bei finaler Gleichverteilung des Analyten im Liberationsmedium ein bestimmter Anteil in der inneren Liberationskammer verbleibt. Der dargestellte Zielwert von 100 % freigesetztem Tyrosin bezieht sich dementsprechend auf das Erreichen des Gleichverteilungszustandes und nicht etwa auf den aus thermodynamischer Sicht unmöglich zu erreichenden Fall, dass die vollständige Menge des vorgelegten Tyrosins in das äußere Liberationsmedium diffundiert wäre.

Nachdem somit die grundsätzliche Eignung der Apparatur zur Ermittlung reproduzierbarer Werte für das Freisetzungsverhalten der Modellsubstanz Tyrosin feststeht, gilt es exemplarisch zu prüfen, ob die bloße Gegenwart eines der zu untersuchenden Partnermoleküle das Experiment prinzipiell beeinträchtigt. Hierfür werden die in Abb. 182 dargestellten Messreihen in Gegenwart von *lmw* Chitosan wiederholt. Die erhaltenen Kurvenverläufe sind in Abb. 183 zu sehen.

Ein Vergleich der korrespondierenden Kurvenverläufe aus Abb. 182 und Abb. 183 ergibt, dass bei grundsätzlich analogem Verlauf in Gegenwart von *lmw* Chitosan systematisch zu jedem Zeitpunkt leicht niedrigere prozentuale Freisetzungen an Tyrosin gemessen werden, was aufgrund der unter diesen Konditionen erhöhten Viskosität der Chitosanlösung, wie sie in Abschnitt 4.4.2.2 besprochen wird, trivial verständlich ist. Eine Abhängigkeit von der absoluten Tyrosinkonzentration ist hingegen nicht zu beobachten.

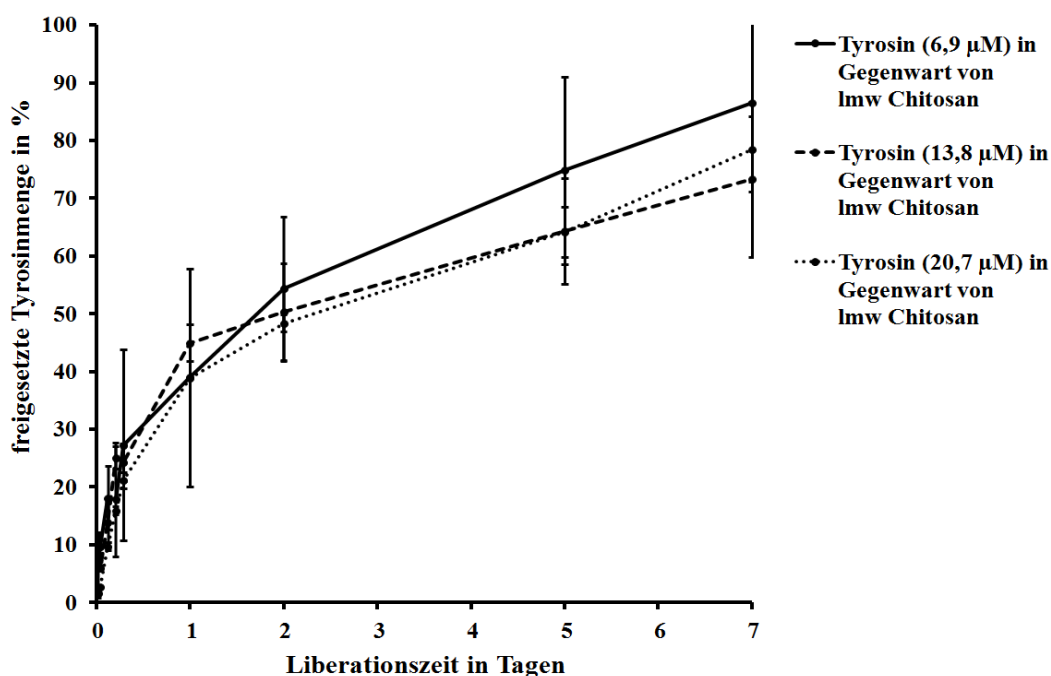


Abb. 183: Dialyseliberationskurven für Tyrosinlösungen bei pH 3,0 in Gegenwart von 1 mg/ml *lmw* Chitosan über einen Gesamtzeitraum von 7 Tagen (Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen)

Da die erhaltenen Dialyseliberationskurven selbst am finalen Messpunkt nach 7 Tagen noch einen gewissen Anstieg aufweisen, werden alle Folgeexperimente an GnRH-Antagonisten und ihren Komplexformulierungen auf einen Untersuchungszeitraum von 28 Tagen ausgedehnt.

4.5.1.2 Charakterisierung für reale Peptidsysteme unter Verwendung von Cetrorelix-Lösungen

Reale GnRH-Antagonisten besitzen aufgrund ihrer im Vergleich zu Tyrosin deutlich komplexeren Struktur Eigenschaften, die sich nicht hinreichend mit der genannten Modellsubstanz simulieren lassen, weshalb eine Anwendbarkeit der entwickelten Dialyseliberationsapparatur auf die realen Peptide anhand von Cetrorelix zwingend zu prüfen ist.

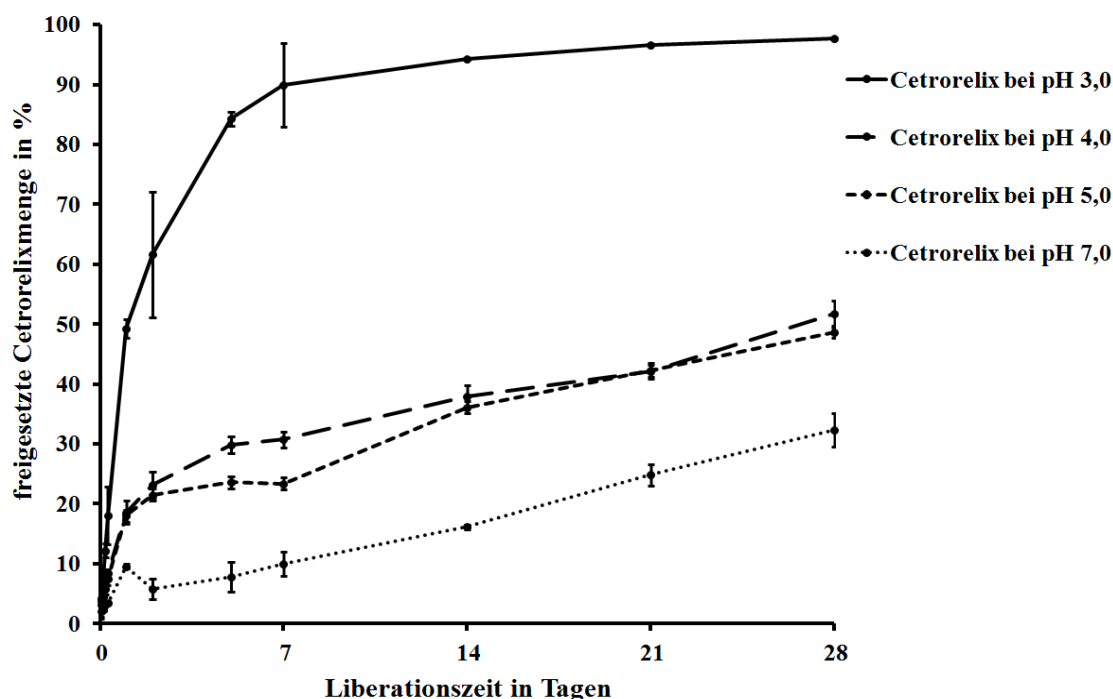


Abb. 184: Dialyseliberationskurven für Cetrorelix-Lösungen in Abhängigkeit vom pH-Wert über einen Gesamtzeitraum von 28 Tagen (Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen)

In Abb. 184 ist der zeitabhängige Verlauf der prozentualen Freisetzung von Cetrorelix in das äußere Liberationsgefäß über einen Zeitraum von insgesamt 28 Tagen dargestellt. Dabei sind die erhaltenen Kurven für pH 3,0, pH 4,0, pH 5,0 und pH 7,0 einander gegenüber gestellt. Während in der Messreihe bei pH 3,0 bereits nach etwa 7 Tagen eine vollständige Freisetzung des Wirkstoffes zu erkennen ist, was dem im vorhergehenden Abschnitt für Tyrosin

dargestellten Verhalten entspricht, ergibt sich für alle höheren pH-Werte eine drastische Freisetungsverzögerung, welche dazu führt, dass bei pH 4,0 und pH 5,0 nach 28 Tagen erst ca. 50 % des Wirkstoffes die Membran passiert haben, und im Fall der Untersuchung bei pH 7,0 sogar lediglich ca. 30 % des Peptides im Untersuchungszeitraum freigesetzt werden.

In allen Fällen liegt makroskopisch ein nicht durch Zentrifugation zu trennendes, flüssiges System vor und die monomere Größe von Cetorelix liegt mit weniger als 1,5 kDa deutlich unter dem MWCO der Dialysemembran von ca. 12 kDa. Da jedoch ausschließlich für pH 3,0 das für eine frei diffundierende Spezies charakteristische Dialyseliberationsprofil resultiert, kann an dieser Stelle geschlussfolgert werden, dass einerseits bei allen höheren pH-Werten von Aggregationsgraden des Peptides auszugehen ist, die eine Molekülgröße von mehr als 12 kDa hervorrufen und andererseits daraus resultierende Beweglichkeitsunterschiede mithilfe der entwickelten Apparatur erfasst werden können.

4.5.2 Liberationsexperimente mit Polysacchariden als Partnermoleküle

4.5.2.1 Liberationsuntersuchungen mit Chitosanen als kationische Polysaccharide

Chitosan dient als Modell für kationische Polysaccharide als Komplexpartner und wurde bereits früher in der Arbeitsgruppe in dieser Funktion für die Generierung von GnRH-Antagonist-Komplexen mit Depoteigenschaft eingesetzt. Folglich wurde auch das Freisetungsverhalten speziell von Komplexen aus Cetorelix und *lmw* Chitosan bereits mittels des vormals etablierten statischen Liberationsexperimentes untersucht [vgl. Pietzsch, 2008; Schamberger, 2009; Beil, 2012(1); Schamberger, 2014]. Die Notwendigkeit, eine Charakterisierung eben solcher Komplexe im Rahmen der vorliegenden Arbeit erneut vornehmen zu müssen, ergibt sich aus dem deutlich veränderten Grundprinzip des eingesetzten Liberationsexperimentes (vgl. Abschnitt 3.20).

Die ermittelten Dialyseliberationskurven für Cetorelix-Formulierungen mit *lmw* Chitosan sind in Abb. 185 in Abhängigkeit vom pH-Wert zusammengestellt. Ein Vergleich zwischen den korrespondierenden Kurven aus Abb. 184 und Abb. 185 in Abwesenheit bzw. Präsenz von *lmw* Chitosan offenbart spontan die Erkenntnis, dass das Partnermolekül Chitosan im Rahmen des neu entwickelten Liberationsverfahrens keinerlei nennenswerten Einfluss auf die Freisetzung des GnRH-Antagonisten nimmt, was in scharfem Kontrast zu den Ergebnissen der erwähnten früheren Arbeiten steht.

Der N-Acetylierungsgrad (DA) von Chitosan beeinflusst in erheblichem Ausmaß die Lösungseigenschaften und Interaktionsmöglichkeiten dieses Komplexpartners (vgl. Abschnitt 1.4.1), weshalb eine Untersuchung des potentiellen Einflusses dieses Charakteristikums auf das Freisetzungsverhalten entsprechender Komplexe mit Cetrorelix angebracht erscheint.

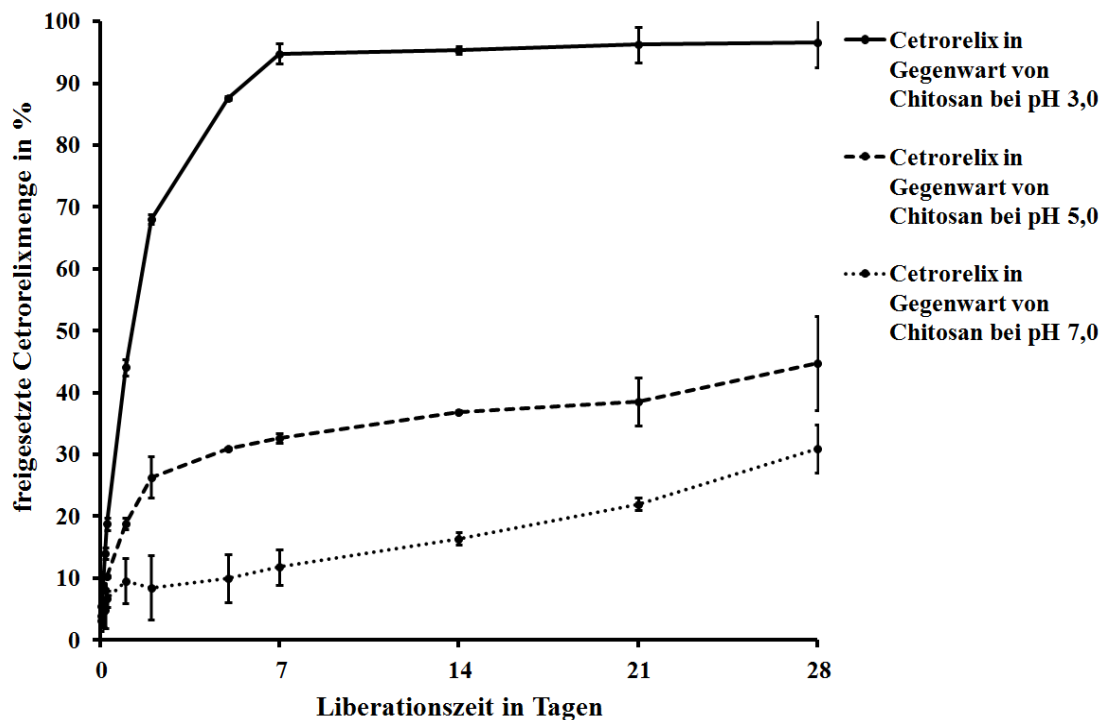


Abb. 185: Dialyseliberationskurven für Cetrorelix-Formulierungen mit *lmw* Chitosan in Abhängigkeit vom pH-Wert über einen Gesamtzeitraum von 28 Tagen (Massenverhältnis von Partnermolekül zu Cetrorelix 1 : 1; Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen)

Abb. 186 veranschaulicht diesbezüglich zunächst das Dialyseliberationsverhalten von Cetrorelix in Formulierungen mit N-acetyliertem *lmw* Chitosan bei pH 3,0. Die gemäß Abschnitt 3.18 hergestellten Chitosane besitzen N-Acetylierungsgrade (DA) von 19 %, 29 % bzw. 44 %, wohingegen handelsübliches *lmw* Chitosan einen DA von ca. 10 % aufweist. Anhand der Abbildung ist allerdings klar zu erkennen, dass unabhängig vom vorliegenden DA keines der betrachteten Chitosane einen bedeutenden Einfluss auf die Freisetzung des GnRH-Antagonisten ausübt, was die Erkenntnisse aus dem vorhergehenden Abschnitt bestätigt.

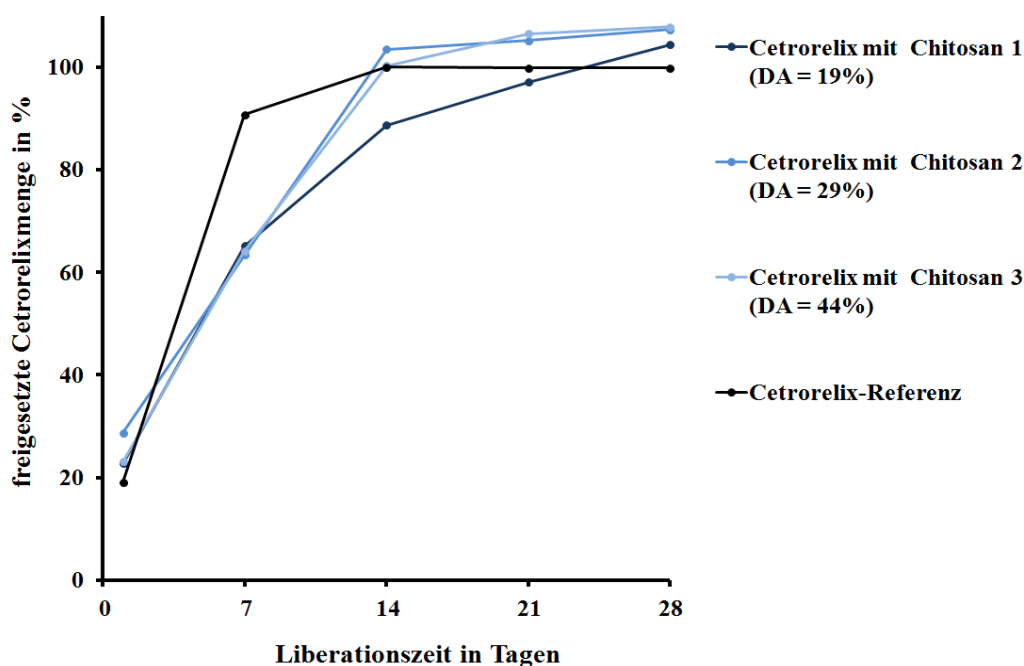


Abb. 186: Dialyseliberationskurven für Cetorelix-Formulierungen mit *lmw* Chitosan variablen N-Acetylierungsgrades bei pH 3,0 über einen Gesamtzeitraum von 28 Tagen (Massenverhältnis von Partnermolekül zu Cetorelix 1 : 1)

Die Resultate der analogen Untersuchungsreihen bei pH 5,0 und pH 7,0 sind in Abb. 187 zusammen gestellt. Wiederum zeigt sich kein signifikanter Effekt aufgrund der Anwesenheit der Chitosane in den Proben. Die Kurvenverläufe entsprechen vollständig dem Verhalten des reinen Peptides unter den gewählten Bedingungen.

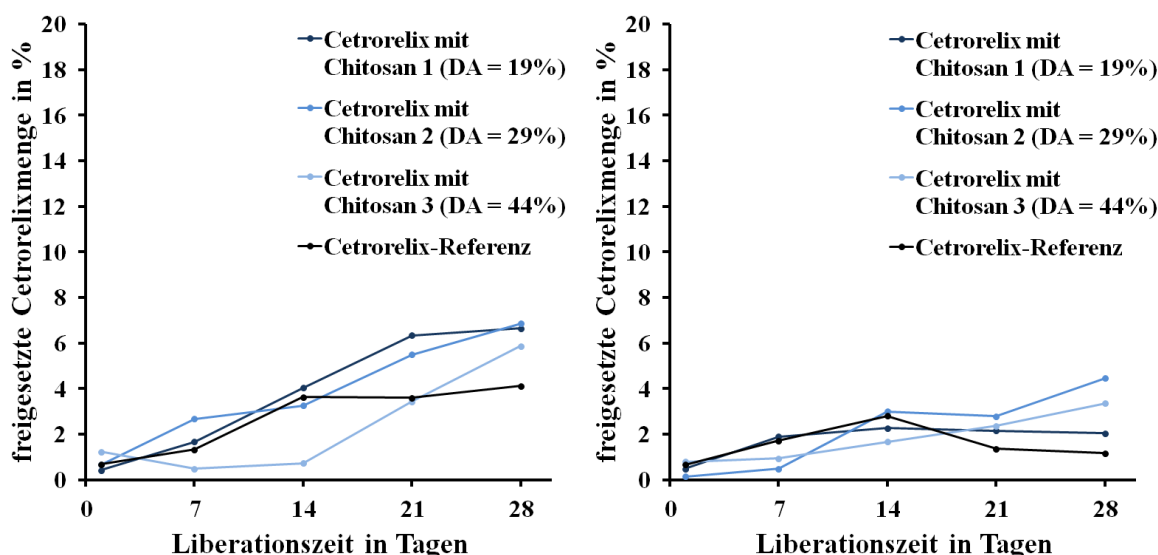


Abb. 187: Dialyseliberationskurven für Cetorelix-Formulierungen mit *lmw* Chitosan variablen N-Acetylierungsgrades bei pH 5,0 (links) und pH 7,0 (rechts) über einen Gesamtzeitraum von 28 Tagen (Massenverhältnis von Partnermolekül zu Cetorelix 1 : 1)

4.5.2.2 Liberationsuntersuchungen mit Stärkekomponenten als neutrale Polysaccharide

Verschiedene Stärkekomponenten werden in der vorliegenden Arbeit als Vertreter neutraler Polysaccharide als potentielle Komplexparker untersucht. Wie in Abschnitt 4.4.2.1 ausgeführt, wird für Cetrorelix in Gegenwart von Amylose schon bei pH-Werten zwischen 3,0 und 4,0 eine makroskopische Präzipitatbildung beobachtet, welche in dieser Form für keinen weiteren der untersuchten GnRH-Antagonist-Komplexe mit Polysacchariden zu verzeichnen ist. Eine Charakterisierung des Freisetungsverhaltens solcher Komplexe ist daher insbesondere im genannten pH-Bereich von Interesse.

Abb. 188 zeigt die resultierenden Dialyseliberationskurven für Cetrorelix-Komplexe mit verschiedenen Stärkekomponenten bei pH 3,0. Im Verhältnis zur ebenfalls abgebildeten Cetrorelix-Referenz erfolgt stets eine deutlich verringerte Freisetzung des Peptides aus den Komplexen, was einerseits an einem reduzierten Anstieg der Kurven festzumachen ist, darüber hinaus aber genauso an einem offensichtlich reduzierten Zielwert der asymptotischen Annäherung der freigesetzten Cetrorelixmenge. Die beobachtete Reduktion der Wirkstoff-freisetzung ist im Fall der komplexen löslichen Stärke als Komplexparker stärker ausgeprägt als im Fall der reinen Komponenten Amylose und Amylopektin, die sich untereinander jedoch nicht signifikant unterscheiden.

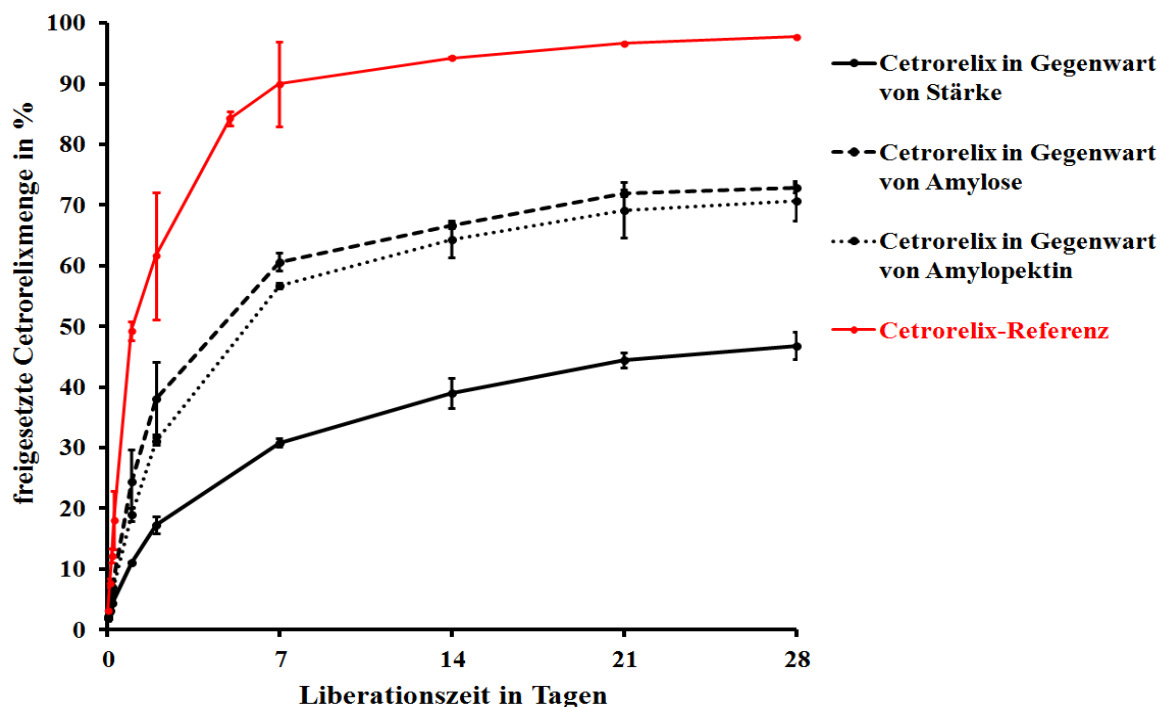


Abb. 188: Dialyseliberationskurven für Cetrorelix-Formulierungen mit löslicher Stärke, Amylose bzw. Amylopektin bei pH 3,0 über einen Gesamtzeitraum von 28 Tagen (Massenverhältnis von Partnermolekül zu Cetrorelix 1 : 1; Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen)

Die für pH 4,0 erhaltenen Liberationskurven sind in Abb. 189 dargestellt. Wiederum ist eine deutliche Reduktion der freigesetzten Wirkstoffmenge über den gesamten Zeitraum in jedem Fall ersichtlich.

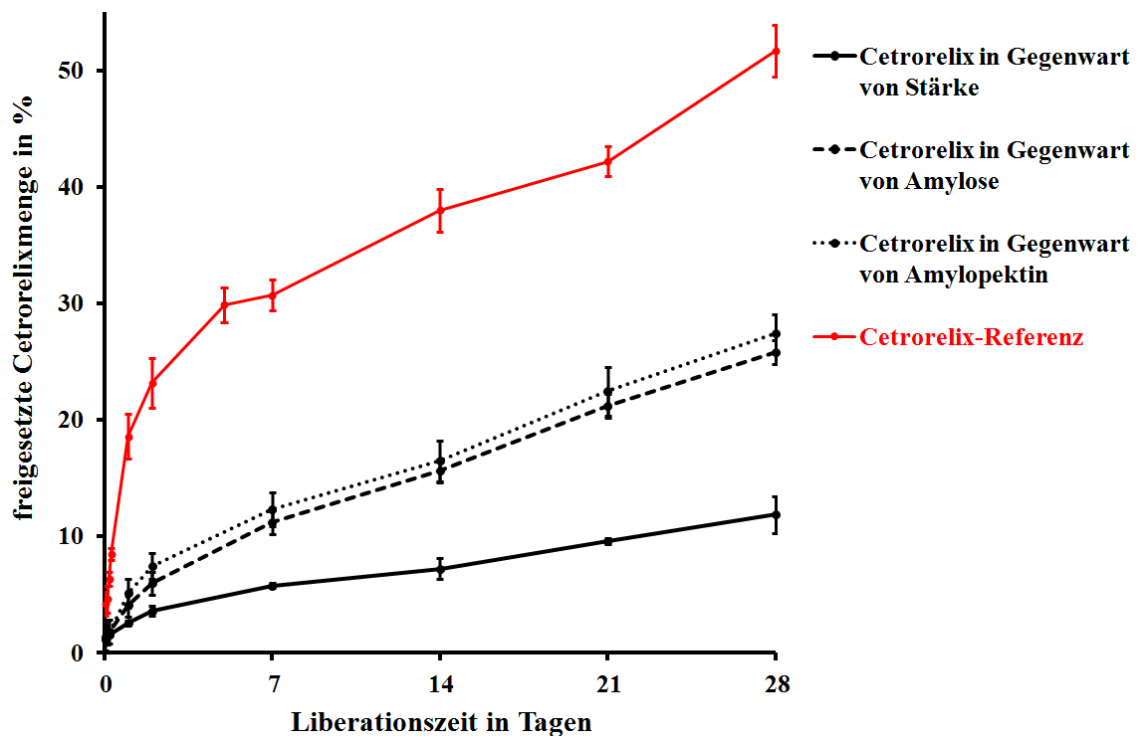


Abb. 189: Dialyseliberationskurven für Cetrorelix-Formulierungen mit löslicher Stärke, Amylose bzw. Amylopektin bei pH 4,0 über einen Gesamtzeitraum von 28 Tagen (Massenverhältnis von Partnermolekül zu Cetrorelix 1 : 1; Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen)

Interessanterweise resultiert bei diesem pH-Wert für die Cetrorelix-Referenz nach einer initialen Phase mit annähernd unverzügter Wirkstofffreisetzung eine sich über mehrere Wochen erstreckende Anschlussphase, in der ein nahezu linearer Anstieg der Cetrorelixkonzentration im äußeren Liberationsgefäß detektiert wird. Diese zweite Phase wird auch in den Komplexen des Peptides mit Stärkekomponten beobachtet, wobei der Anstieg im Fall der Amylose- und Amylopektinkomplexe exakt demjenigen entspricht, welcher auch für die Cetrorelix-Referenz ermittelt wird, während er in Gegenwart löslicher Stärke deutlich geringer ausfällt. Die für die Referenz beobachtete initiale Phase, die durch eine verstärkte Freisetzung gekennzeichnet ist, tritt hingegen in den Komplexen mit Stärkekomponten in stark abgeschwächter Form auf.

4.5.2.3 Liberationsuntersuchungen mit Alginat und Hyaluronat als anionische Polysaccharide

Um das Verhalten von GnRH-Antagonisten in Komplexen mit anionischen Polysacchariden exemplarisch beleuchten zu können, werden in der vorliegenden Arbeit Cetorelix-Komplexe mit Alginat und Hyaluronat generiert und mithilfe der Dialyseliberation näher analysiert.

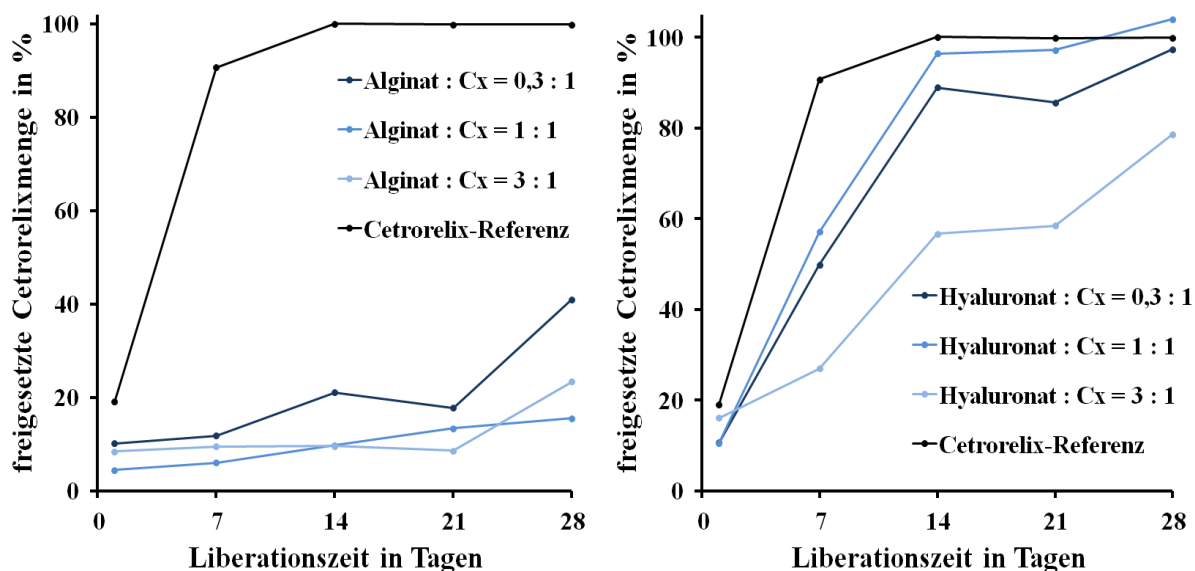


Abb. 190: Dialyseliberationskurven von Cetorelix-Formulierungen mit Alginat (links) bzw. Hyaluronat (rechts) bei pH 3,0 über einen Gesamtzeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexpartner im Ansatz)

In Abb. 190 ist das Liberationsverhalten von Alginat- und Hyaluronat-Komplexen von Cetorelix bei pH 3,0 jeweils für mehrere verschiedene Massenverhältnisse zwischen Partnermolekül und Peptid dargestellt. Es ist auf den ersten Blick zu erkennen, dass eine erhebliche Diskrepanz zwischen dem Verhalten des Peptides in Gegenwart von Alginat und demjenigen in Gegenwart von Hyaluronat besteht. Während in allen Alginat-Komplexen die Freisetzung von Cetorelix über den gesamten Zeitraum stark verringert wird, scheinen zumindest die Hyaluronat-Komplexe mit den Massenverhältnissen 0,3 : 1 und 1 : 1 zwischen Polysaccharid und Peptid kaum einen Retardeffekt zu generieren. Der Komplex mit dem höchsten Hyaluronat-Anteil zeigt zwar eine markante Freisetzungverzögerung, diese erreicht aber bei weitem nicht das für Alginat beobachtete Ausmaß.

Abb. 191 veranschaulicht das Verhalten korrespondierender Komplexe bei pH 5,0. Bei diesem pH-Wert werden sowohl für die Alginat-, wie auch für die Hyaluronat-Komplexe nur äußerst geringe Freisetzungsraten ermittelt. Im Falle des Hyaluronats verlaufen die

Liberationskurven der Komplexe signifikant über derjenigen der Cetrorelix-Referenz, wohingegen im Fall des Alginats die entsprechenden Kurven stets unterhalb der Referenzkurve verlaufen. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass Alginat Komplexe mit Cetrorelix bildet, die ein Retardverhalten bezüglich der Peptidfreisetzung zeigen, während die Komplexe mit Hyaluronat in irgendeiner Form die Membranpassage sogar zu beschleunigen vermögen.

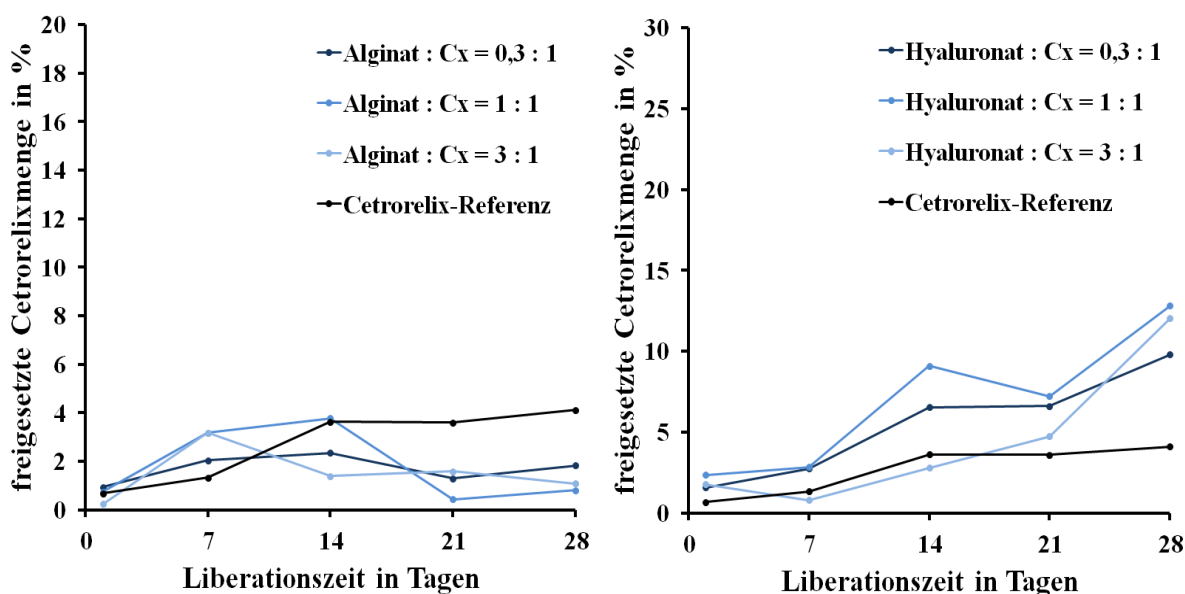


Abb. 191: Dialyseliberationskurven von Cetrorelix-Formulierungen mit Alginat (links) bzw. Hyaluronat (rechts) bei pH 5,0 über einen Gesamtzeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexpartner im Ansatz)

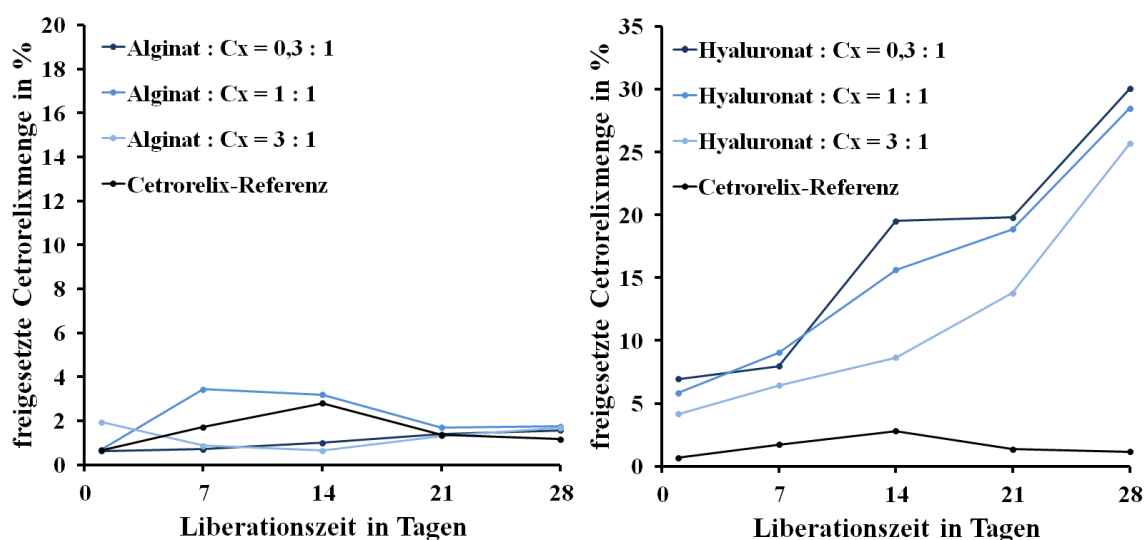


Abb. 192: Dialyseliberationskurven von Cetrorelix-Formulierungen mit Alginat (links) bzw. Hyaluronat (rechts) bei pH 7,0 über einen Gesamtzeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexpartner im Ansatz)

Bei pH 7,0 ist dieser grundlegende Unterschied zwischen den beiden Polysacchariden noch deutlicher ausgeprägt, wie in Abb. 192 ersichtlich wird. In Gegenwart des Hyaluronats scheint eine erhebliche Mobilisierung des Wirkstoffes zu erfolgen, sodass innerhalb der 28 Tage bis zu 30 % des vorgelegten Cetorelix die Membran passieren kann. In scharfem Kontrast dazu wird aus der Peptid-Referenz ohne Partnermolekül unter diesen pH-Bedingungen im betreffenden Zeitraum weniger als 4 % des Wirkstoffes in das äußere Liberationsgefäß überführt und in Gegenwart von Alginat sogar weniger als 2 %. Der Effekt ist offensichtlich reproduzierbar nachweisbar, jedoch nicht trivial verständlich.

4.5.3 Liberationsexperimente mit der ungetrennten Gallotanninmischung und den methanolytisch gewonnenen finalen Tanninspezies

4.5.3.1 Freisetzungsexperimente mit der ungetrennten Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* in Abhängigkeit vom NaCl-Gehalt

Die Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* wird in der vorliegenden Arbeit auf ihr Potential als Inhibitor der Amyloid-Bildung von GnRH-Antagonisten untersucht, weshalb bekannte Einflussgrößen auf die Aggregation der genannten Peptide bei der Durchführung der Dialyseliberations-Experimente ebenfalls berücksichtigt werden müssen, um potentiell vorhandene Zusammenhänge zwischen modifizierter Amyloidbildung und Freisetungsverhalten prinzipiell auch erfassen zu können.

Neben dem ausgeprägten Einfluss des pH-Wertes auf die Peptidaggregation ist seit längerem auch der aggregationsverstärkende Einfluss von Natriumchlorid diesbezüglich bekannt (vgl. Lang, 1998). In Abb. 193 sind die Liberationskurven von Cetorelix-Komplexen mit der ungetrennten Gallotanninmischung links ohne Zugabe von Natriumchlorid und rechts in Gegenwart von 0,9 % Natriumchlorid bei pH-Werten zwischen 4,0 und 7,0 vergleichend gegenübergestellt. Darüber hinaus finden sich jeweils auch die korrespondierenden Cetorelix-Referenz-Kurven in Abwesenheit eines Komplexpartners in dieser Abbildung.

Betrachtet man zunächst das Verhalten der Cetorelix-Referenzen, so ist erkennbar, dass neben der bereits besprochenen Verringerung der Peptidfreisetzung mit steigendem pH-Wert auch eine starke Reduktion der freigesetzten Cetorelix-Menge bei gleichem pH-Wert durch die Präsenz des Natriumchlorides bewirkt wird. So beträgt die freigesetzte Cetorelixmenge bei pH 4,0 in dem Experiment ohne Natriumchlorid nach 28 Tagen ca. 21 %, während sie bei demselben pH-Wert in Gegenwart von 0,9 % Natriumchlorid nur noch ca. 3 % umfasst. Dies

entspricht auch den Erwartungen aufgrund der bekanntermaßen verstärkten Aggregation des Peptides durch die Salzzugabe.

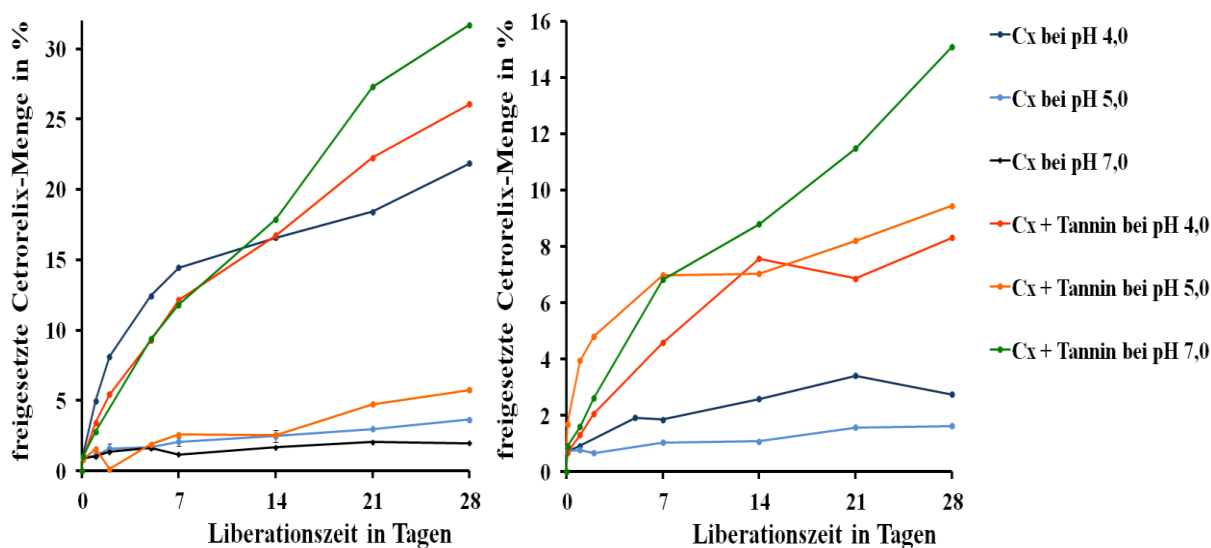


Abb. 193: Dialyseliberationskurven von Cetrorelix-Referenzen und Cetrorelix-Komplexen mit der ungetrennten Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* ohne Zugabe von NaCl (links) bzw. in Gegenwart von 0,9 % NaCl (rechts) in Abhängigkeit vom pH-Wert über 28 Tage; Kurve für Cetrorelix-Referenz bei pH 7,0 fehlt rechts aufgrund technischer Probleme

Das Freisetzungsverhalten aus den Komplexen mit der Gallotanninmischung weicht von den beschriebenen Trends partiell erheblich ab. Ohne Natriumchlorid-Zugabe verlaufen die ermittelten Liberationskurven für pH 4,0 und pH 5,0 sehr ähnlich zu den Kurven der jeweiligen Referenzen, womit sich auch in diesem Fall der Trend zu bestätigen scheint, dass eine Erhöhung des pH-Wertes mit einer Verringerung der Membranpassage einhergeht. Für pH 7,0 wird jedoch ein drastisch anderes Verhalten beobachtet. Die Peptidfreisetzung erfolgt bei diesem hohen pH-Wert sehr rasch aus den Komplexen, sodass sogar eine höhere Endfreisetzung realisiert wird als bei pH 4,0.

Die darin zum Ausdruck kommende Sondersituation bei pH 7,0 wird prinzipiell auch in den Natriumchlorid-haltigen Messreihen erkannt, wobei jedoch festzuhalten ist, dass die Salzzugabe auch für die Komplexe die Freisetzung stets gegenüber den korrespondierenden Proben ohne Natriumchlorid signifikant herabsetzt. Es ist weiterhin auffällig, dass die Freisetzung in Gegenwart des Salzes für alle pH-Werte aus den Komplexen mit der Gallotanninmischung stets schneller erfolgt als aus den reinen Peptid-Referenzen, was für den pharmakologischen Einsatz von großer Bedeutung ist.

4.5.3.2 Freisetzungsexperimente mit den methanolytisch gewonnenen finalen Tanninspezies

Die finalen Tanninspezies 3GG, 4GG und PGG sind, wie in Abschnitt 4.3.2 dargestellt, in Reinform zugänglich und bewirken eine erhebliche Verringerung des Amyloidgehaltes von GnRH-Antagonisten, wie seinerseits beispielsweise in Abschnitt 4.4.3.6 aus den Ergebnissen der entsprechenden Kongorottitrationen hervorgeht. Daher ist eine Charakterisierung des Freisetungsverhaltens solcher Komplexe von besonderer Bedeutung und wird ausführlich für alle drei zur Verfügung stehenden GnRH-Antagonisten vorgenommen.

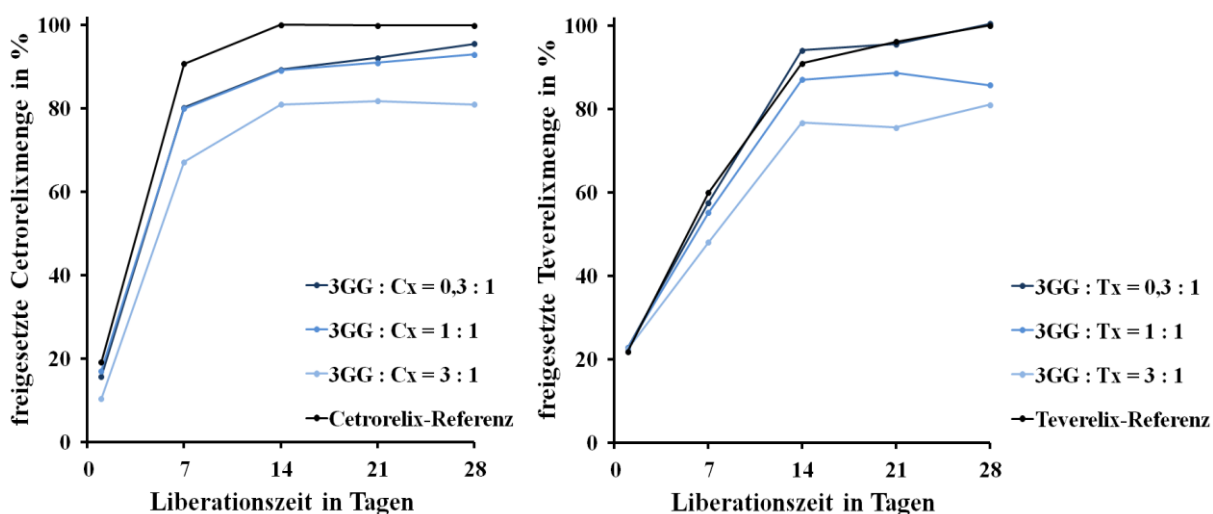


Abb. 194: Dialyseliberationskurven von Cetrorelix- (links) bzw. Teverelix-Formulierungen (rechts) mit der Trigalloylglukose 3GG bei pH 3,0 über einen Zeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexpartner im Ansatz)

Zunächst soll das Verhalten der GnRH-Antagonist-Komplexe mit den drei Tanninspezies bei pH 3,0 im Fokus stehen. Abb. 194 stellt die Liburationskurven von Cetrorelix- und Teverelix-Komplexen mit 3GG bei diesem pH-Wert dar. Für beide GnRH-Antagonisten wird in ähnlicher Form mit zunehmendem Anteil der Tanninspezies im Komplex eine ebenfalls zunehmende Verzögerung der Freisetzung des Peptides beobachtet, sodass für den jeweiligen Komplex mit einem Tannin/Peptid-Massenverhältnis von 3 : 1 eine Verringerung der nach 28 Tagen insgesamt freigesetzten Wirkstoffmenge um ca. 20 % resultiert.

Das in Abb. 195 veranschaulichte Verhalten der jeweils korrespondierenden Komplexe mit der Tetragalloylglukose 4GG als Partnermolekül unterscheidet sich im Fall von Cetrorelix kaum von demjenigen, welches für die Komplexe mit 3GG zu beobachten ist. Im Fall von Teverelix zeitigt hingegen zumindest der Komplex mit dem höchsten Tanninanteil einen

signifikant stärker ausgeprägten Retardeffekt, womit eine finale Verringerung der freigesetzten Peptidmenge um ca. 35 % zu erkennen ist.

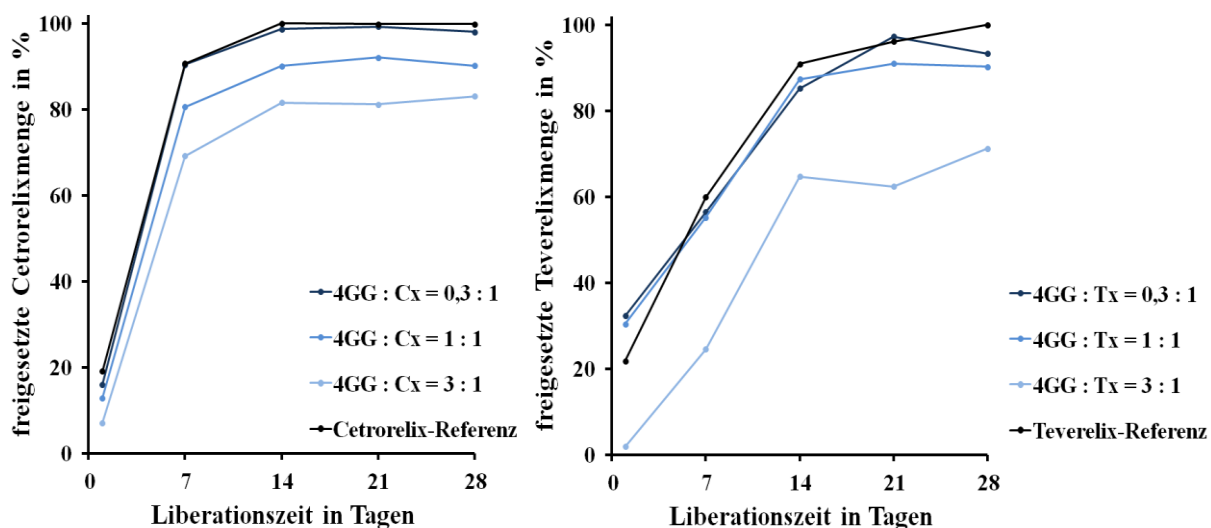


Abb. 195: Dialyseliberationskurven von Cetorelix- (links) bzw. Teverelix-Formulierungen (rechts) mit der Tetragalloylglukose 4GG bei pH 3,0 über einen Zeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexpartner im Ansatz)

Der Einsatz von PGG als Komplexpartner bewirkt schließlich für beide Peptide die stärkste Freisetzungverzögerung, wie in Abb. 196 nachzuvollziehen ist. Derjenige Komplex mit dem höchsten PGG-Anteil führt für Cetorelix-Komplexe zu einer Reduktion der nach 28 Tagen liberierten Peptidmenge um ca. 35 %, wohingegen bei Teverelix erneut eine signifikant stärkere Retardwirkung zu konstatieren ist und die finale Reduktion annähernd 60 % beträgt.

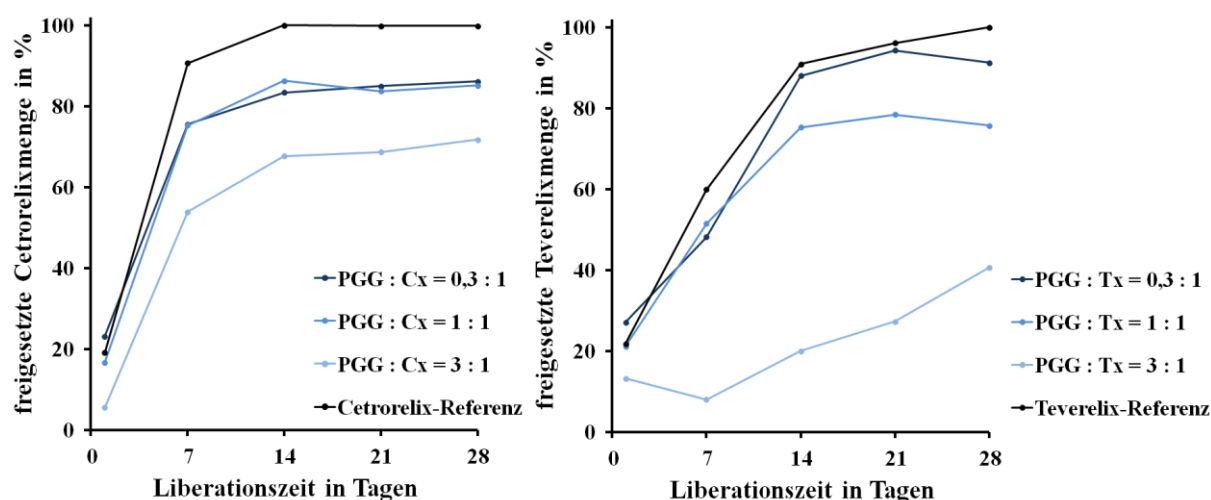


Abb. 196: Dialyseliberationskurven von Cetorelix- (links) bzw. Teverelix-Formulierungen (rechts) mit der Pentagalloylglukose PGG bei pH 3,0 über einen Zeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexpartner im Ansatz)

Für den GnRH-Antagonisten Ozarelix werden bei pH 3,0 unabhängig von der konkret eingesetzten Tanninspezies nur geringe Veränderungen des Liberationsverhaltens gegenüber der reinen Peptid-Referenz detektiert, wie in Abb. 197 anhand der Ergebnisse für 3GG und PGG zu sehen ist.

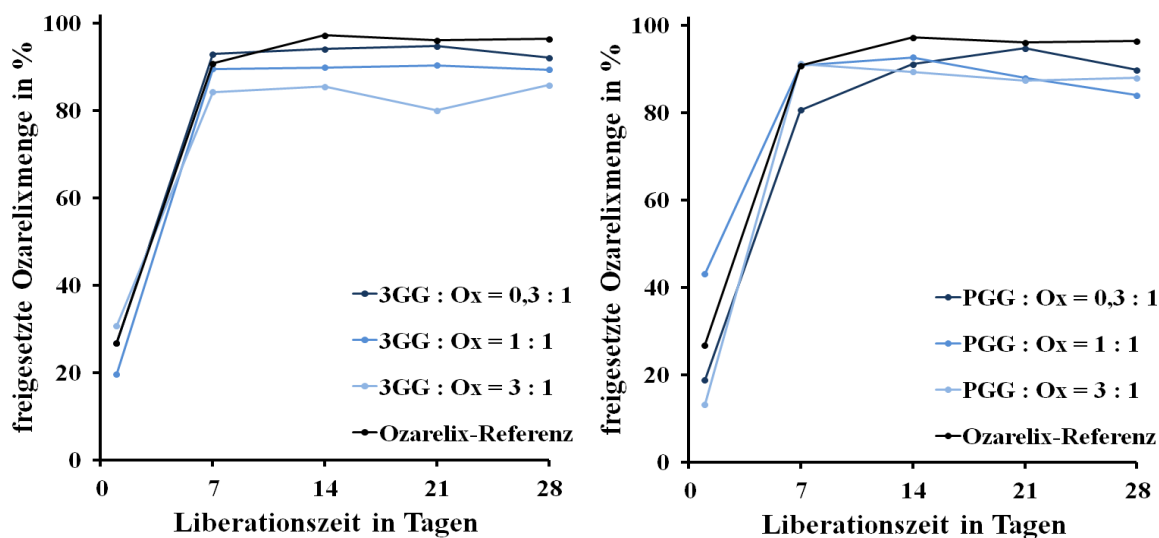


Abb. 197: Dialyseliberationskurven von Ozarelix-Formulierungen mit der Trigalloylglukose 3GG (links) bzw. der Pentagalloylglukose PGG (rechts) bei pH 3,0 über einen Zeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexpartner im Ansatz)

Die drei Tanninspezies 3GG, 4GG und PGG lassen sich selbst, wie in Abschnitt 4.3.2.6 gezeigt, mittels analytischer HPLC sehr gut charakterisieren. Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit, im Verlauf des Dialyseliberationsexperimentes nicht nur die Freisetzung des GnRH-Antagonisten, sondern gleichzeitig auch das Verhalten des Komplexpartners zu analysieren.

Abb. 198 illustriert zunächst das Dialyseliberationsverhalten der Trigalloylglukose 3GG allein, d.h. ohne einen GnRH-Antagonisten, bei pH 3,0 über den Zeitraum des Experimentes anhand analytischer Chromatogramme. Der Elutionspeak der Tanninspezies 3GG selbst ist bei einer Retentionszeit von ca. 18 min zu erkennen. Nach 7 Tagen ist der genannte Peak von 3GG und ein weiterer bei ca. 16 min intensiv im Chromatogramm auffindbar, sodass von einer raschen Freisetzung der Tanninspezies auszugehen ist. In den Folgewochen nimmt die Intensität des 3GG-Peaks allmählich ab und im Gegenzug treten Peaks bei geringeren Retentionszeiten zunehmend auf, wobei insbesondere ein Peak bei 11 min dominante Züge annimmt, der sich zweifelsfrei freier Gallussäure zuordnen lässt, was für eine schrittweise Hydrolyse des Tannins spricht.

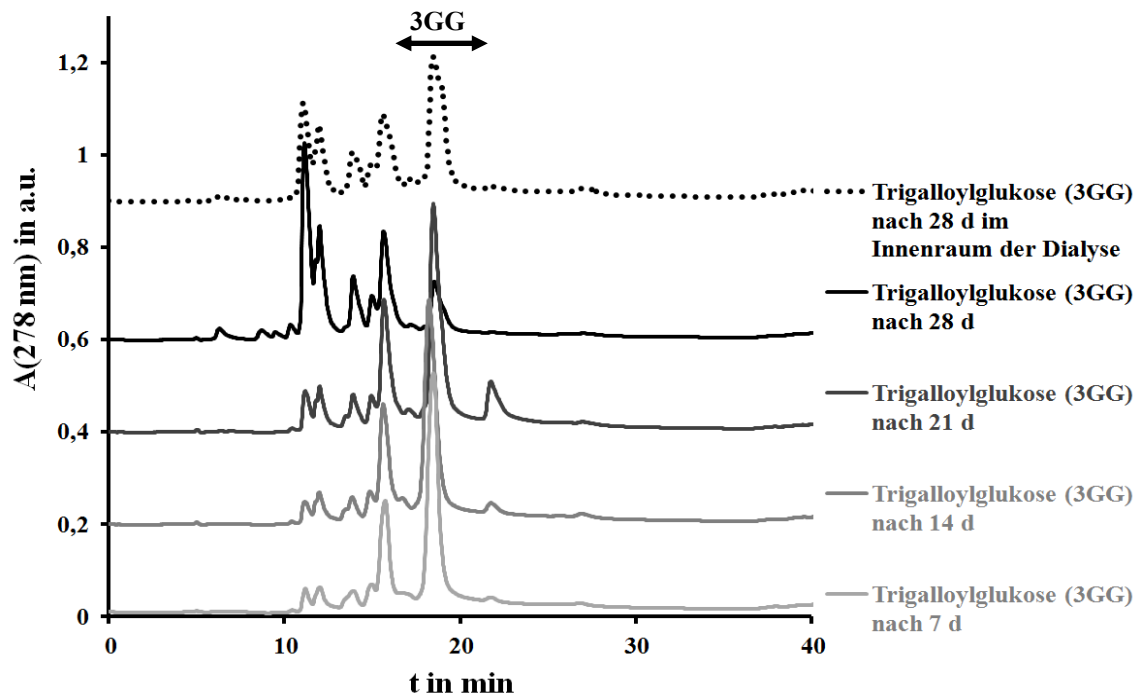


Abb. 198: HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von 3GG ohne GnRH-Antagonisten bei pH 3,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Liberationsgefäß zu verschiedenen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Liberationsgefäß nach Ende des Experimentes

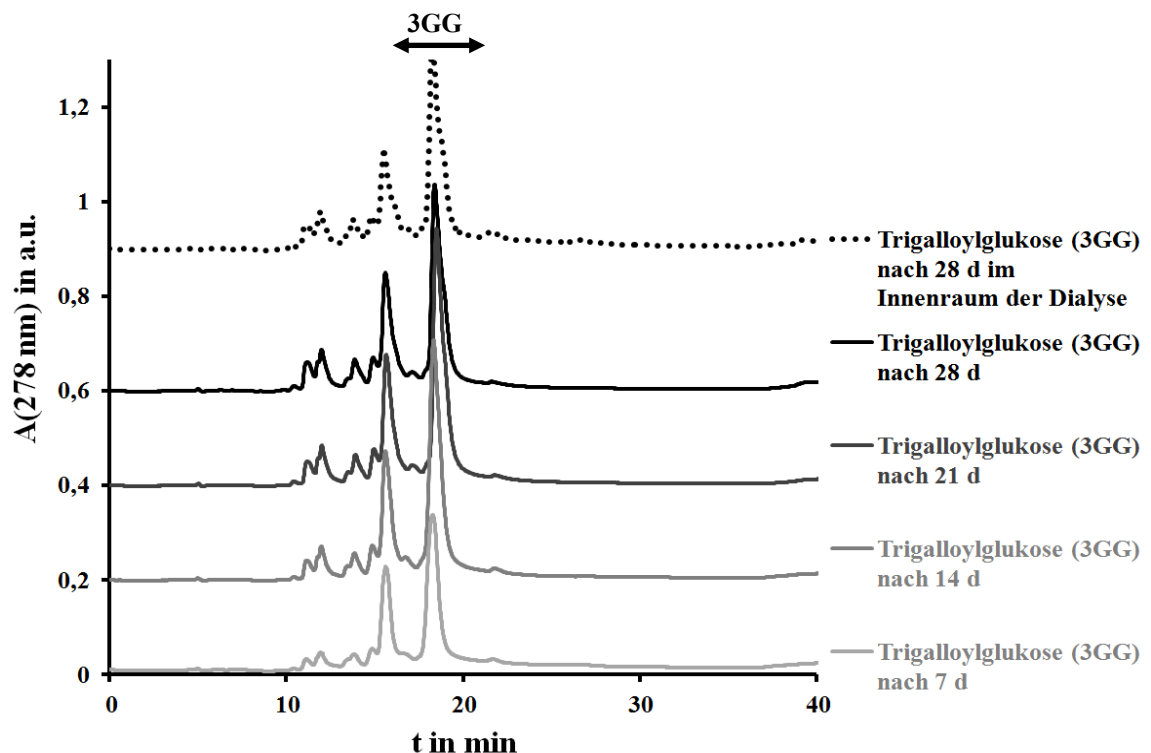


Abb. 199: HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von 3GG in Komplexen mit Cetrarelix bei pH 3,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Liberationsgefäß zu unterschiedlichen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Liberationsgefäß nach Ende des Experimentes

In Abb. 198 wird im inneren Liberationsgefäß nach Abschluss des Experimentes annähernd dieselbe Spezies-Zusammensetzung wie außerhalb gefunden, mit der Ausnahme, dass das Intensitätsverhältnis zwischen Gallussäure- und 3GG-Peak zu Gunsten von 3GG verschoben ist, was möglicherweise darauf hinweist, dass die Hydrolyse im äußeren Liberationsgefäß schneller verläuft als im inneren Gefäß.

Eine entsprechende Untersuchung der liberierten Tanninspezies aus GnRH-Antagonist-Komplexen mit 3GG führt bei pH 3,0 für alle betrachteten GnRH-Antagonisten zu den gleichen Erkenntnissen, die in Abb. 199 an Cetorelix-Komplexen exemplarisch verdeutlicht werden. Zum einen ergibt ein Vergleich mit Abb. 198, dass nach 7 Tagen in Gegenwart des Peptides deutlich weniger 3GG freigesetzt wurde, was gleichsam dazu führt, dass bis zum nächsten Messpunkt nach 14 Tagen noch eine Zunahme des 3GG-Gehaltes im äußeren Liberationsgefäß zu verzeichnen ist. Darüber hinaus werden bis zum Ende des Experimentes Hydrolyseprodukte wie etwa Gallussäure in deutlich geringerem Ausmaß detektiert und die Intensität des 3GG-Peaks nimmt entsprechend auch nicht signifikant ab. Am Ende des Experimentes sprechen die Chromatogramme für eine Gleichverteilung aller Tanninspezies zwischen innerem und äußerem Liberationsgefäß.

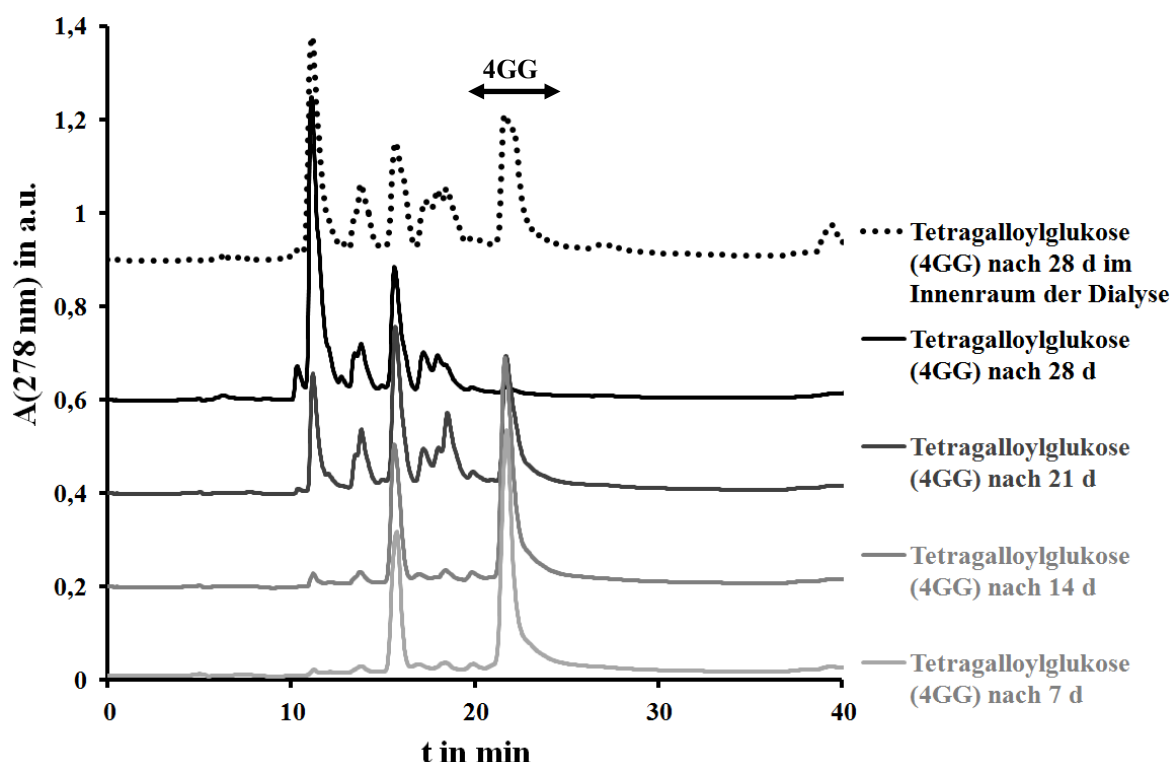


Abb. 200: HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von 4GG ohne GnRH-Antagonisten bei pH 3,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Liberationsgefäß zu verschiedenen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Liberationsgefäß nach Ende des Experimentes

Abb. 200 enthält die analytischen Chromatogramme der Dialyseliberation von 4GG bei pH 3,0 ohne GnRH-Antagonisten. Der 4GG-Peak ist bei einer Retentionszeit von ca. 22 min sichtbar. In völliger Analogie zu dem Verhalten von 3GG wird bereits nach 7 Tagen eine nahezu vollständige Freisetzung des Tannins und in der Folge eine allmähliche Abnahme des 4GG-Peaks unter Ausbildung neuer Peaks bei geringeren Retentionszeiten beobachtet. Ein Vergleich der Chromatogramme des inneren und des äußeren Liberationsgefäßes deutet erneut auf eine im äußeren Gefäß verstärkt ablaufende Hydrolyse, da gleichfalls eine verstärkten Präsenz von Gallussäure im äußeren Gefäß zu verzeichnen ist.

Die korrespondierenden Chromatogramme aus den Messreihen an Komplexen von GnRH-Antagonisten mit 4GG ergeben kein völlig übereinstimmendes Bild. Während für Cetrorelix annähernd zu Abb. 200 deckungsgleiche Chromatogramme samt der beschriebenen Hydrolyseprodukte zu erkennen sind, wird für Ozarelix in Analogie zu den Ergebnissen aus Abb. 199 lediglich eine verzögerte Freisetzung von 4GG ohne jedes Anzeichen für eine Hydrolyse detektiert. Für Teverelix resultiert eine Art Mischform beider Varianten, die in Abb. 201 zu sehen ist. Nach einer zeitlich verzögerten Freisetzung von 4GG innerhalb der ersten zwei Wochen tritt eine im Vergleich zu Abb. 200 verspätete Hydrolyse zu Tage.

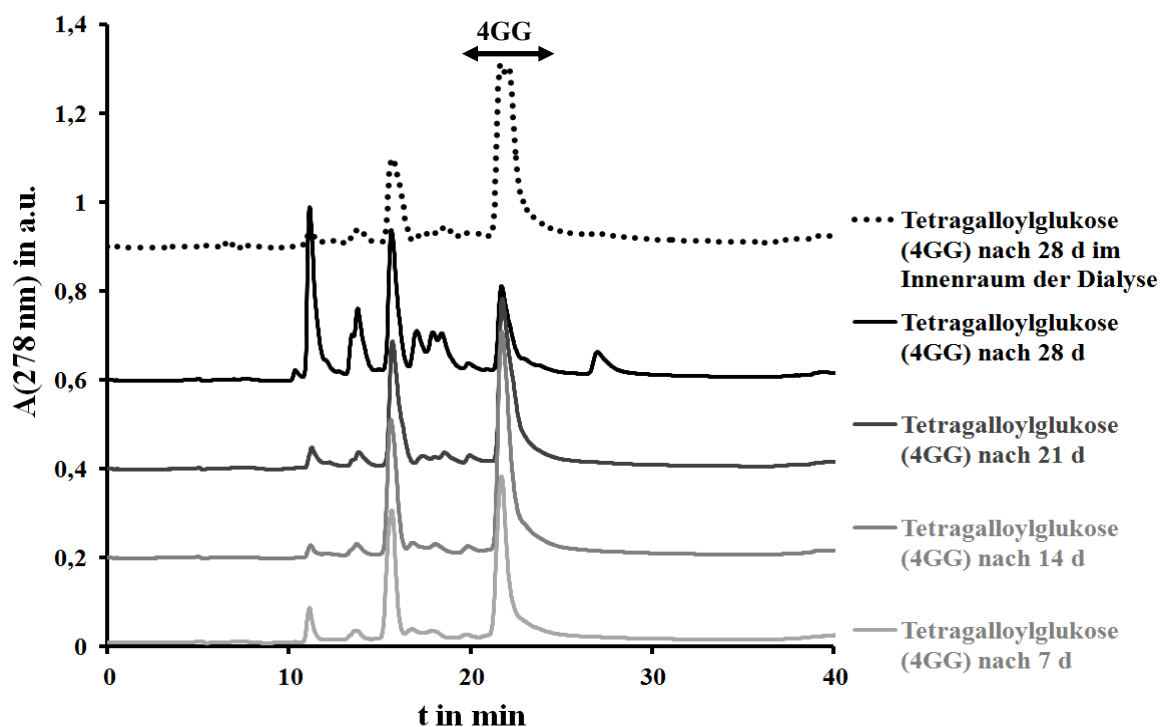


Abb. 201: HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von 4GG in Komplexen mit Teverelix bei pH 3,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Liberationsgefäß zu unterschiedlichen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Liberationsgefäß nach Ende des Experimentes

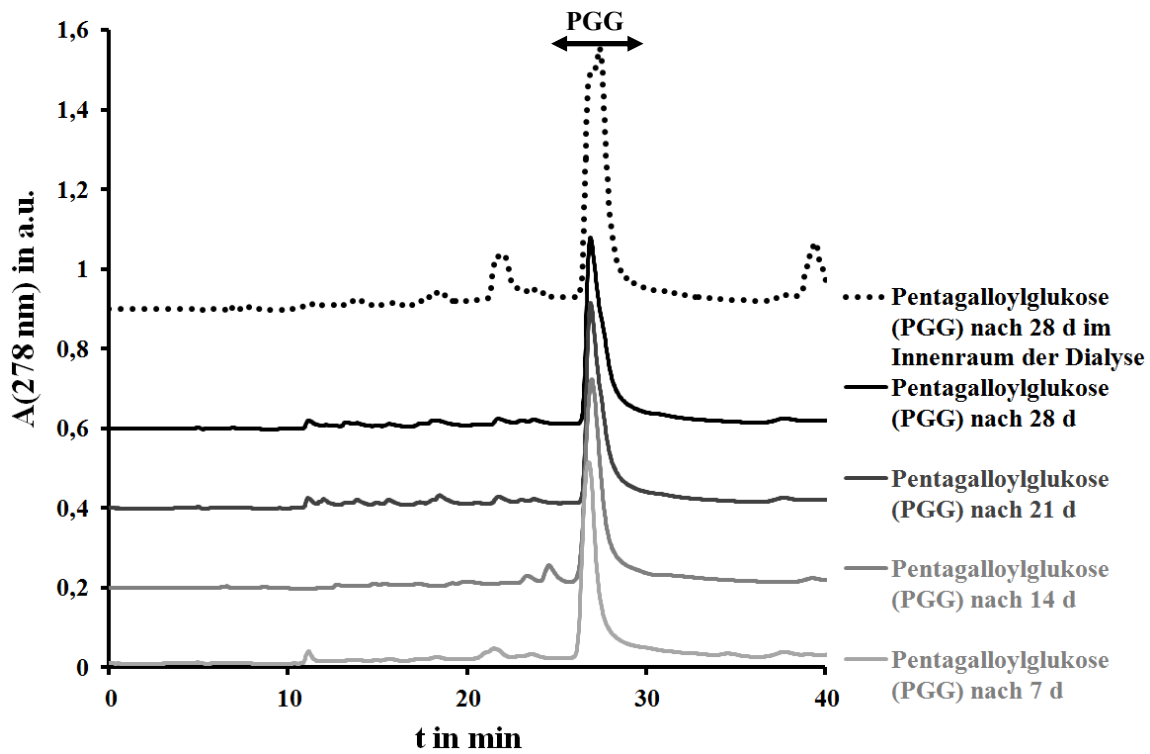


Abb. 202: HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von PGG ohne GnRH-Antagonisten bei pH 3,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Liberationsgefäß zu verschiedenen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Liberationsgefäß nach Ende des Experimentes

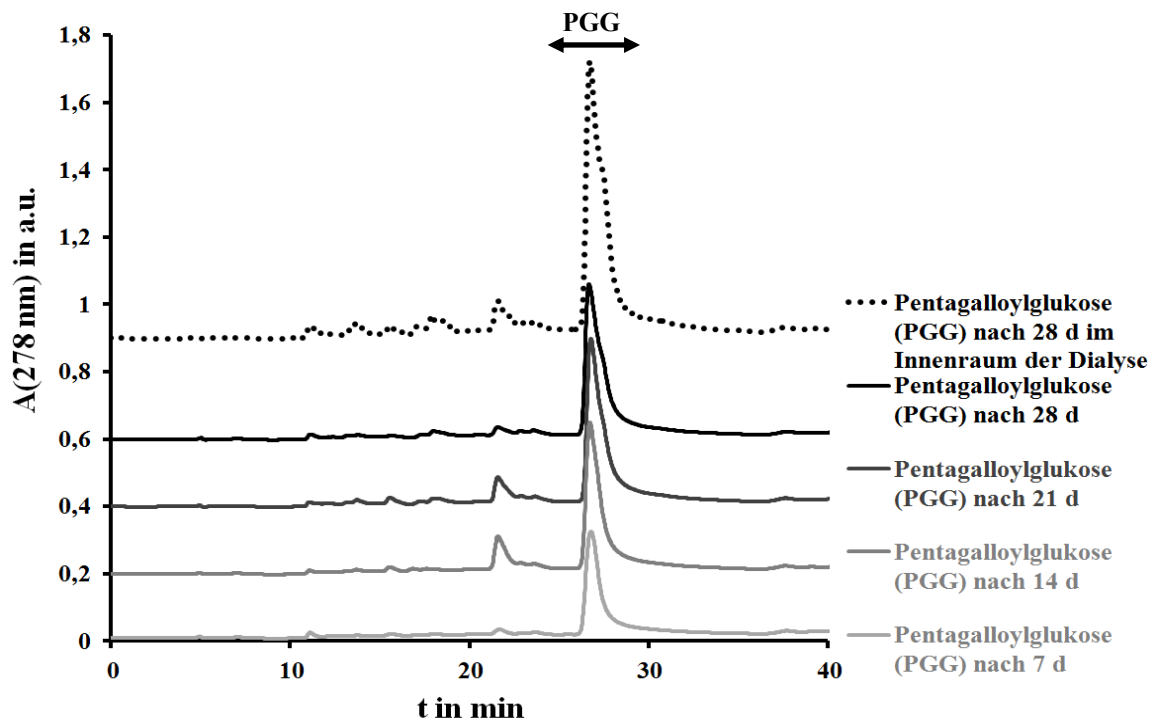


Abb. 203: HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von PGG in Komplexen mit Ozarelix bei pH 3,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Liberationsgefäß zu unterschiedlichen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Liberationsgefäß nach Ende des Experimentes

Das Verhalten von PGG weicht von den beiden zuvor behandelten Tanninspezies insofern ab, als dass in diesem Fall bei pH 3,0 auch für die peptidfreie Referenz keine signifikanten Hydrolyseerscheinungen festzustellen sind, wie in Abb. 202 klar ersichtlich ist. Es tritt zu jedem Messzeitpunkt jeweils nur der PGG-Peak bei ca. 26 min auf. Weiterhin geht aus einem Vergleich der Intensitäten des PGG-Peaks im inneren und äußeren Liberationsgefäß am Ende des Experimentes hervor, dass selbst nach 28 Tagen noch keine Gleichverteilung der Substanz durch die Membran erfolgt ist, sondern immer noch ein erheblicher Konzentrationsüberschuss im inneren Gefäß besteht.

In Gegenwart der GnRH-Antagonisten erfolgt bei sonst sehr ähnlichem Verhalten eine verzögerte Liberation von PGG innerhalb der ersten 14 Tage des Experimentes, wie in Abb. 203 exemplarisch an Ozarelix-Komplexen dargestellt.

Die Untersuchungen zum Dialyseliberationsverhalten von Cetrorelix- und Ozarelix-Komplexen mit den drei Tanninspezies 3GG, 4GG und PGG ergeben bei pH 5,0 bezüglich der Peptidfreisetzung in den meisten Fällen keine signifikanten Abweichungen der erhaltenen Kurven vom Verhalten für die reine Peptid-Referenz. Lediglich exemplarisch sind daher im linken Teil von Abb. 204 die Resultate für Cetrorelix-Komplexe mit unterschiedlichen Massenanteilen an PGG angeführt.

Deutliche Unterschiede zwischen der Peptid-Referenz und den entsprechenden Komplexen zeigen sich hingegen für Teverelix, wie im rechten Teil von Abb. 204 anhand der Komplexe mit PGG zu sehen ist. Für diesen Antagonisten zeigt sich auch für pH 5,0 eine zunehmende Retardwirkung mit steigendem Tanninanteil im Komplex.

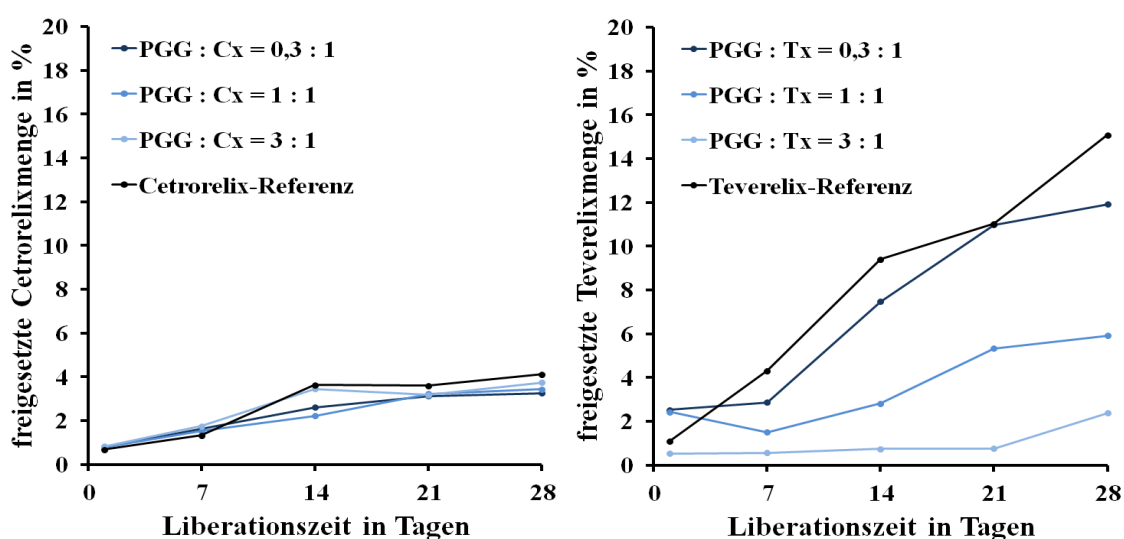


Abb. 204: Dialyseliberationskurven von Cetrorelix- (links) bzw. Teverelix-Formulierungen (rechts) mit der Pentagalloylglukose PGG bei pH 5,0 über einen Zeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexparker im Ansatz)

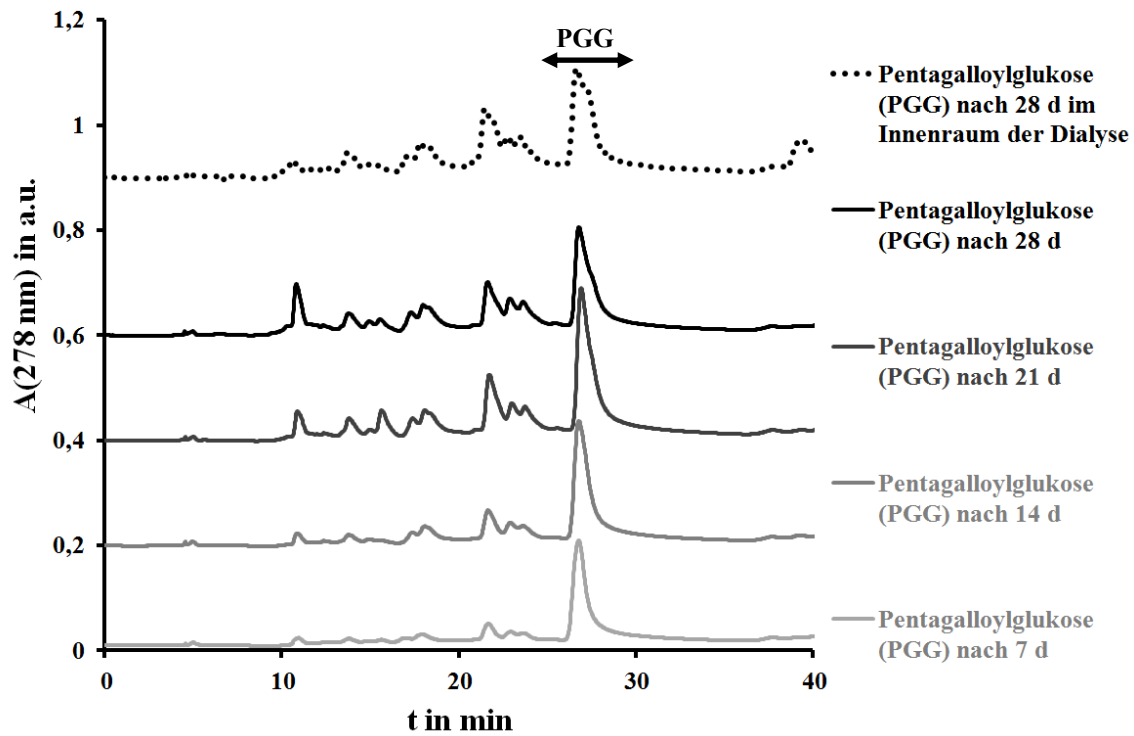


Abb. 205: HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von PGG ohne GnRH-Antagonisten bei pH 5,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Liberationsgefäß zu verschiedenen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Liberationsgefäß nach Ende des Experimentes

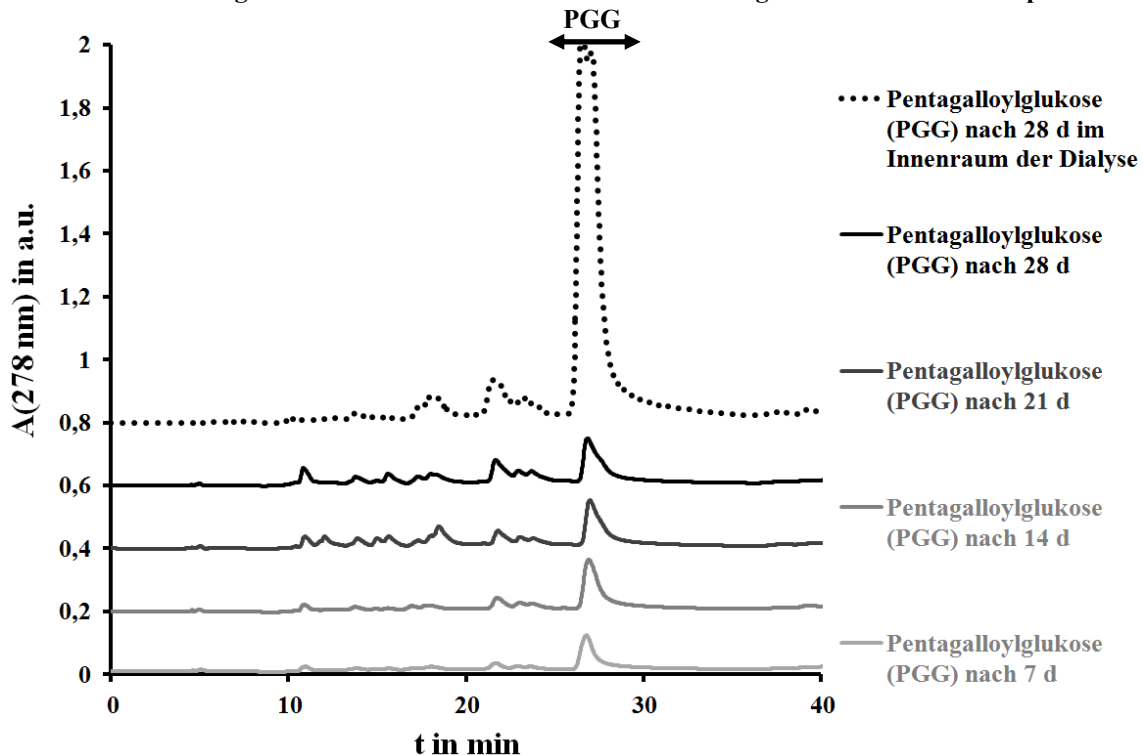


Abb. 206: HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von PGG in Komplexen mit Teverelix bei pH 5,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Liberationsgefäß zu unterschiedlichen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Liberationsgefäß nach Ende des Experimentes

Vergleicht man unter diesem Gesichtspunkt die während des Dialyseliberations-Experimentes bei pH 5,0 aufgenommenen HPLC-Chromatogramme für reine PGG in Abb. 205 mit denen von Teverelix-PGG-Komplexen in Abb. 206, wird offenkundig, dass in Gegenwart von Teverelix unter diesen Bedingungen auch ein Großteil des Tannins zum Ende des Experimentes die Membran noch nicht passiert hat, wohingegen in der peptidfreien Referenz eine rasche Gleichverteilung zwischen innerem und äußerem Liberationsgefäß zu beobachten ist. Eine solchartige Hinderung der Tanninpassage wird weder für Cetrorelix noch für Ozarelix verzeichnet, tritt im Fall von Teverelix jedoch für alle drei Tanninspezies zu Tage und deutet daher auf eine für dieses Peptid spezifische Interaktion mit den Tanninspezies hin. Die hierfür ermittelten Chromatogramme und Liberationskurven werden an dieser Stelle nicht explizit dargestellt, können bei Bedarf aber von der Anhang-DVD unter "Tanninfreisetzung_Dialyseliberation" bzw. für die korrespondierenden Peptidfreisetzungskurven unter "Dialyseliberation" abgerufen werden.

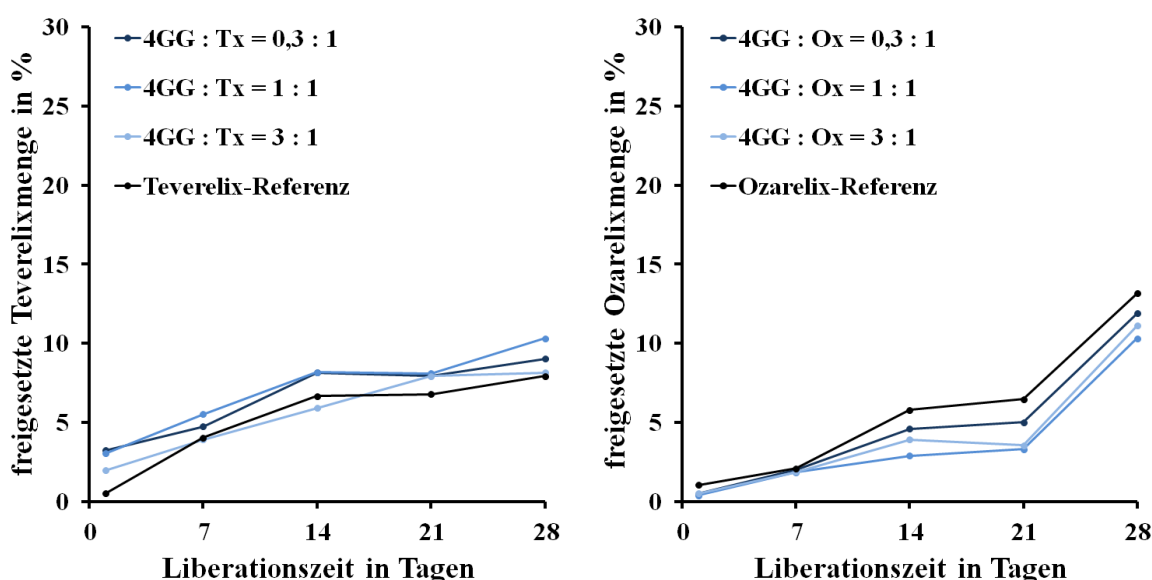


Abb. 207: Dialyseliberationskurven von Teverelix- (links) bzw. Ozarelix-Formulierungen (rechts) mit der Tetragalloylglukose 4GG bei pH 7,0 über einen Zeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexpartner im Ansatz)

Dialyseliberations-Untersuchungen an GnRH-Antagonist-Komplexen mit 3GG, 4GG und PGG bei pH 7,0 belegen in keinem Fall eine signifikante Beeinflussung des Liberationsverhaltens der Peptide, wie in Abb. 207 beispielhaft für Teverelix- und Ozarelix-Formulierungen mit der Tetragalloylglukose 4GG veranschaulicht. Die korrespondierenden HPLC-Chromatogramme zur begleitenden Tanninanalytik weisen bei pH 7,0 nur sehr wenige

Peaks auf, wie in der Abb. 208 exemplarisch für reine 4GG zu sehen. Im äußeren Libervationsgefäß wird stets nur ein Signal nahe dem Einspritzpeak bei ca. 5 min detektiert. Im inneren Gefäß findet sich nach Ende des Experimentes in der Regel nur noch eine verschwindend geringe Menge des eingesetzten Tannins, sodass bei diesem pH-Wert von intensiven Degradationsvorgängen der Tannine auszugehen ist. Gleichfalls tritt in allen tanninhaltigen Proben bei pH 7,0 eine zunehmende Gelbfärbung des Mediums im Verlauf des Experimentes auf.

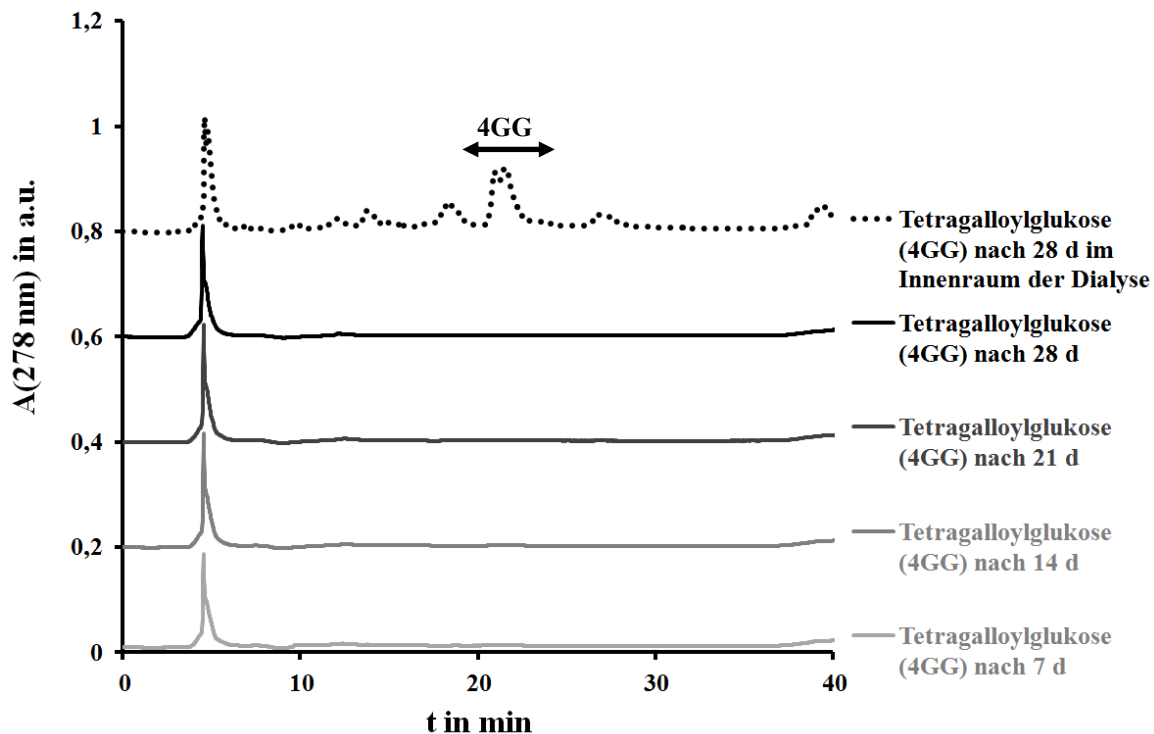


Abb. 208: HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von 4GG ohne GnRH-Antagonisten bei pH 7,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Libervationsgefäß zu verschiedenen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Libervationsgefäß nach Ende des Experimentes

4.5.4 Liberationsexperimente mit chromatographisch gewonnenen Tanninfraktionen

4.5.4.1 Freisetzungsexperimente mit den Teilfraktionen der Tanninfraktion TaF3

Tanninfraktion TaF3 und ihre Teilfraktionen besitzen hinsichtlich der in Abschnitt 4.4.3 mittels Kongorottitration untersuchten inhibierenden Wirkung auf die Amyloidbildung von GnRH-Antagonisten den größten Einfluss aller im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysierten Tanninfraktionen bzw. -spezies, weshalb detaillierte Studien zum

Dialyseliberationsverhalten der Komplexe jener Tanninfraktionen mit allen drei GnRH-Antagonisten durchgeführt werden. Die diesbezüglichen Ergebnisse an Cetrorelix-Komplexen wurden bereits in der Bachelorarbeit von B.Sc. C. Grundmann dargestellt [Grundmann, 2014] und werden daher an dieser Stelle nicht näher erläutert. Grundsätzlich bestehen jedoch erhebliche Gemeinsamkeiten zum Verhalten der entsprechenden Teverelix-Komplexe, welche im Folgenden den Resultaten an Ozarelix-Komplexen gegenüber gestellt werden.

Bei pH 3,0 zeigt sich für alle GnRH-Antagonist-Komplexe mit Teilfraktionen der Tanninfraktion TaF3 ein zunehmender Retardeffekt bezüglich der Peptidfreisetzung mit steigendem Tanninanteil im Komplex, wie anhand von Abb. 209 exemplarisch für Teverelix- und Ozarelix-Komplexe mit der Teilfraktion TaF3_Peak2 nachzuvollziehen ist. In diesem Fall beträgt die final freigesetzte Wirkstoffmenge nach 28 Tagen für den jeweiligen Komplex mit dem höchsten Tanninanteil im Fall von Teverelix ca. 75 % und im Fall von Ozarelix ca. 65 %, sodass der Retardeffekt für Ozarelix etwas stärker ausgeprägt ist. Für die anderen Teilfraktionen von Tanninfraktion TaF3 wird stets ein analoges Verhalten mit nur geringen Abweichungen beobachtet, wobei sich in allen Fällen der Trend bestätigt, dass der Retardeffekt für Ozarelix stärker ausgeprägt ist. Die entsprechenden Kurven können bei Interesse der Anhang-DVD unter "Dialyseliberation" entnommen werden.

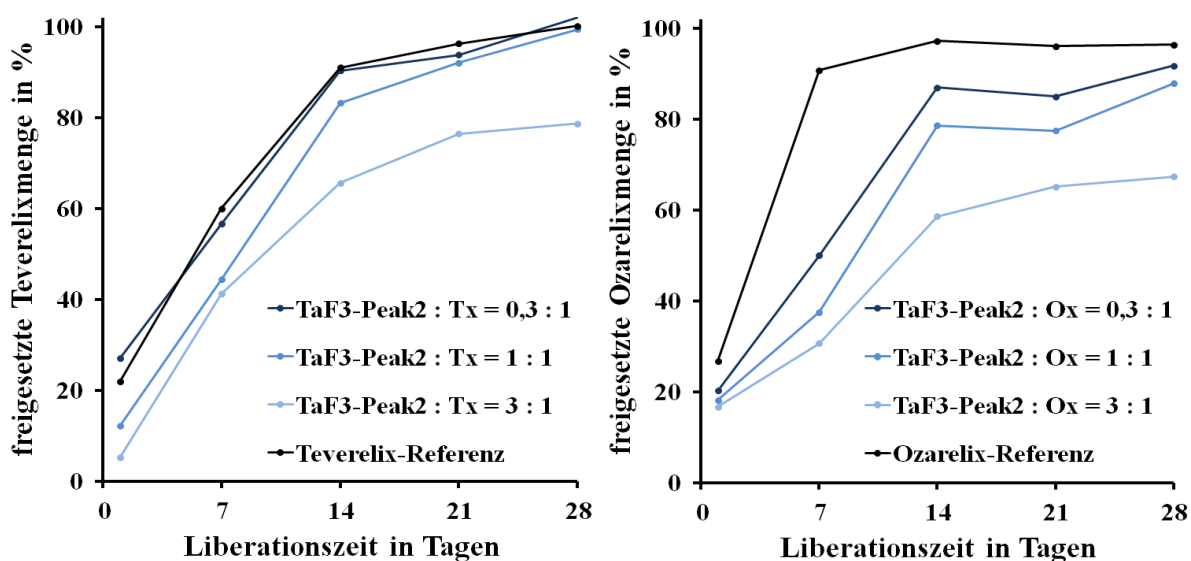


Abb. 209: Dialyseliberationskurven von Teverelix- (links) bzw. Ozarelix-Formulierungen (rechts) mit der Teilfraktion TaF3-Peak2 bei pH 3,0 über einen Zeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexpartner im Ansatz)

Betrachtet man die Freisetzung der Tanninspezies im Verlauf des Experimentes in Abb. 210, so fällt auf, dass insbesondere der Peak der Gallussäure bei 11 min im Verlauf der Liberation zunimmt, was für eine allmähliche Hydrolyse der Ester- und Depsidbindungen der Tanninspezies spricht.

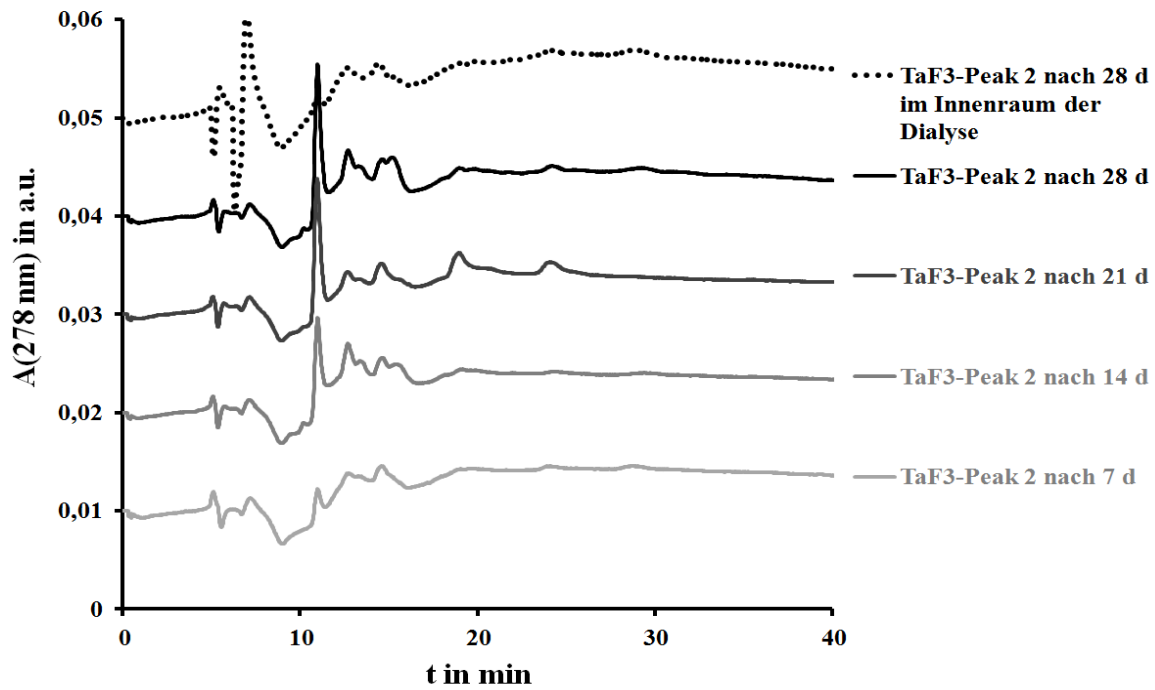


Abb. 210: HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von TaF3-Peak2 bei pH 3,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Liberationsgefäß zu verschiedenen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Liberationsgefäß nach Ende des Experimentes

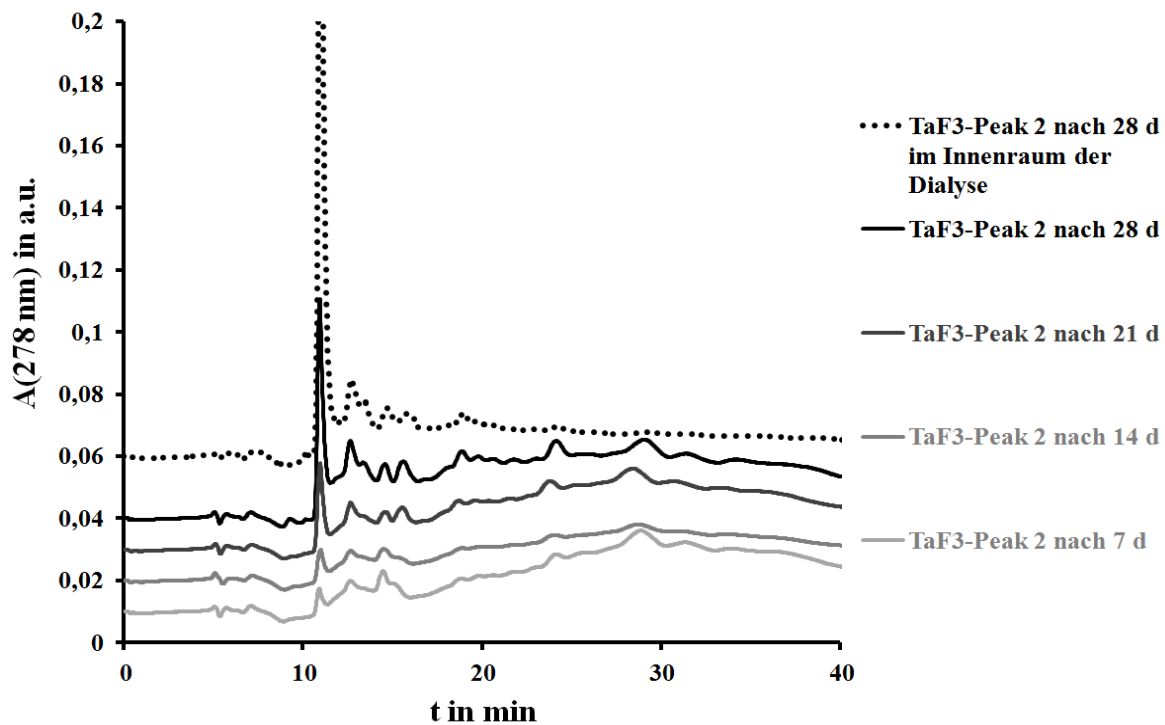


Abb. 211: HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von TaF3-Peak2 aus Komplexen mit Ozarelix bei pH 3,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Liberationsgefäß zu verschiedenen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Liberationsgefäß nach Ende des Experimentes

Das zeitlich zunehmende Auftreten von Gallussäure ist in Gegenwart von Ozarelix noch deutlich intensiver zu sehen, wie anhand von Abb. 211 ersichtlich wird. In den Messreihen mit Teverelix-Komplexen gleichen die Peakintensitäten hingegen denen aus der peptidfreien Messreihe von Abb. 210 (nicht dargestellt).

Bei einem pH-Wert von 5,0 ist ebenfalls für alle Teverelix- und Ozarelix-Komplexe mit den Teilfraktionen der Tanninfraktion TaF3 ein Retardeffekt zu verzeichnen, der mit zunehmendem Tanninanteil in der Komplexformulierung selbst auch zunimmt. Da sich die ermittelten Dialyseliberationskurven für die einzelnen Teilfraktionen recht ähnlich sind, stehen die in Abb. 212 wiedergegebenen Kurven der Komplexe mit der Teilfraktion TaF3_Peak2 stellvertretend für alle weiteren Messreihen bei diesem pH-Wert. Die Grundfreisetzung des GnRH-Antagonisten ohne Komplexpartner ist selbstredend im Fall von Ozarelix deutlich höher als für Teverelix. Für beide Peptide wird jedoch übereinstimmend für den jeweiligen Komplex mit einem Tannin/Peptid-Massenverhältnis von 3 : 1 nach 28 Tagen nur etwa 50 % der Gesamtfreisetzung der korrespondierenden Peptid-Referenz detektiert.

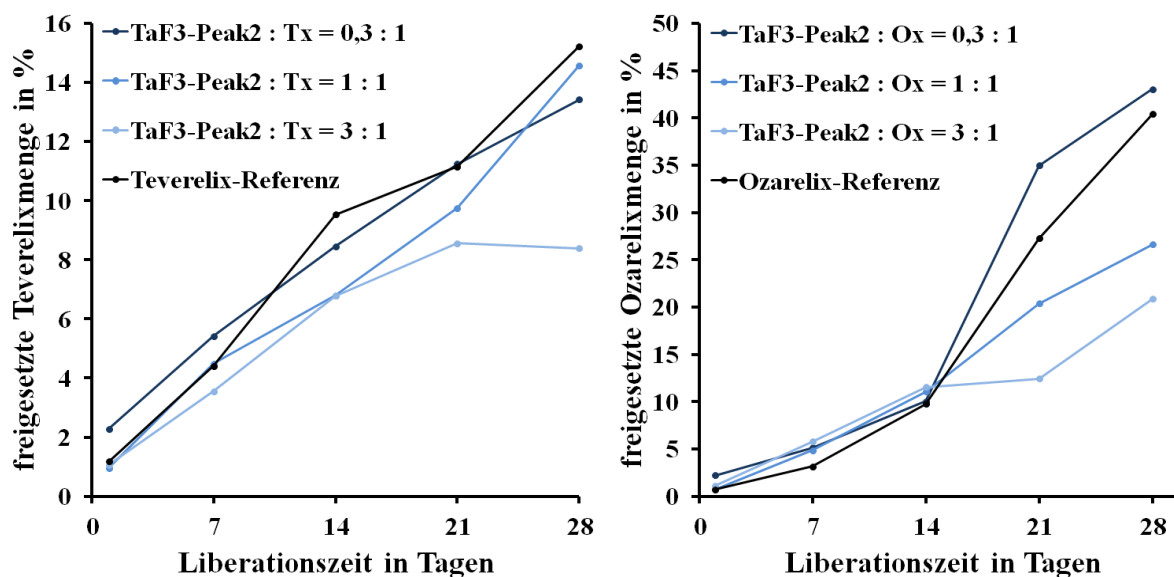


Abb. 212: Dialyseliberationskurven von Teverelix- (links) bzw. Ozarelix-Formulierungen (rechts) mit der Teilfraktion TaF3-Peak2 bei pH 5,0 über einen Zeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexpartner im Ansatz)

Die zeitabhängig freigesetzten bzw. am Ende des Experimentes bei pH 5,0 noch immer im inneren Liburationsgefäß zurückgehaltenen Tanninspezies sind in den HPLC-Chromatogrammen von Abb. 213 für die Durchführung des Versuches ohne GnRH-Antagonisten und in Abb. 214 für die Durchführung mit Ozarelix als Komplexpartner gegenübergestellt.

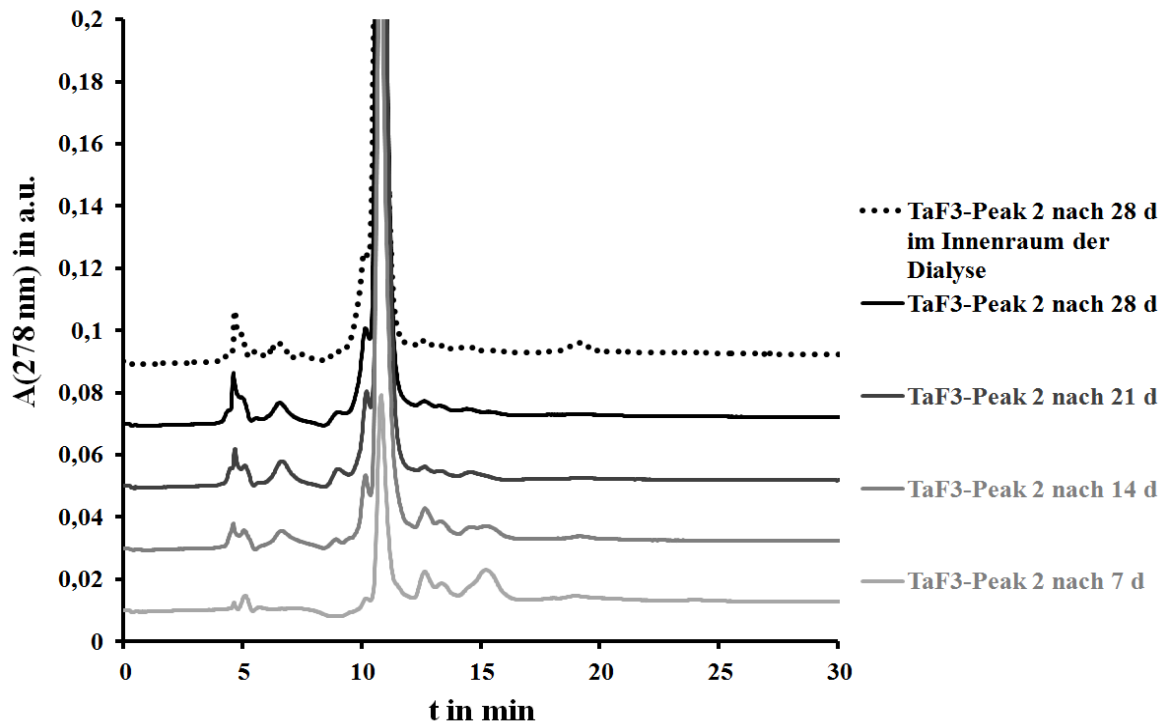


Abb. 213: HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von TaF3-Peak2 bei pH 5,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Libervationsgefäß zu verschiedenen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Libervationsgefäß nach Ende des Experimentes

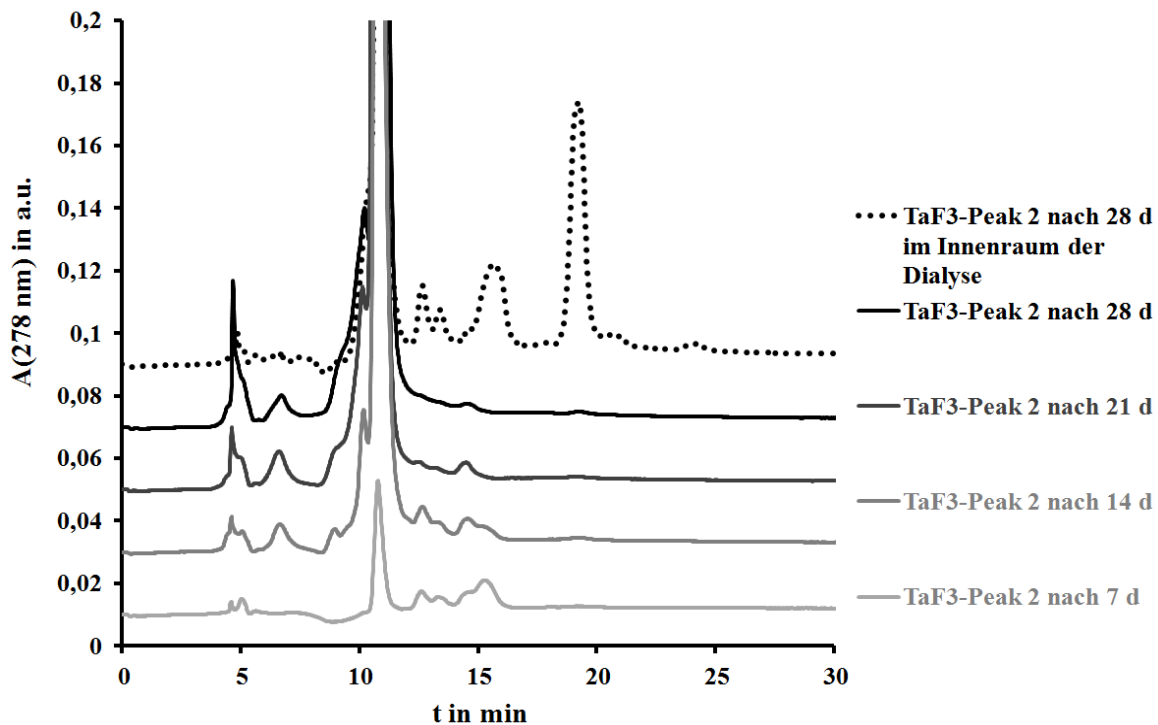


Abb. 214: HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von TaF3-Peak2 aus Komplexen mit Ozarelix bei pH 5,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Libervationsgefäß zu verschiedenen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Libervationsgefäß nach Ende des Experimentes

Neben der Feststellung, dass in großen Mengen Gallussäure mit einer Retentionszeit von 11 min detektiert wird und die Peaks größerer freigesetzter Tanninspezies bei Retentionszeiten zwischen 12 und 15 min nach der ersten Woche schrittweise abnehmen und daher offensichtlich einer Degradation unterliegen, fällt insbesondere ins Auge, dass in Gegenwart von Ozarelix am Ende des Experimentes mehrere Spezies mit markanten Peaks zwischen 12 und 20 min im inneren Liberationsgefäß nachweisbar sind, die anscheinend weder degradiert noch anteilig durch die Membran diffundiert sind. Ein völlig analoges Ergebnis zeigt sich auch für Teverelix (nicht dargestellt).

Das ermittelte Dialyseliberationsverhalten solcher Komplexe bei pH 7,0 unterscheidet sich teilweise gravierend von den bisher besprochenen Fällen. Mangels signifikanter Diskrepanzen zwischen den einzelnen Teilfraktionen dient erneut die Teilfraktion TaF3_Peak2 als Beispiel. In Abb. 215 sind die Liberationskurven für entsprechende Teverelix- und Ozarelix-Komplexe veranschaulicht. In diesem Fall wird in keinem Fall ein Retardeffekt beobachtet, sondern ganz im Gegenteil erfolgt in der Regel eine deutlich schnellere Freisetzung des Wirkstoffes unter diesen Konditionen, wobei die Freisetzung aus dem jeweiligen Komplex mit dem höchsten Tanninanteil stets am schnellsten geschieht. Für Ozarelix ist der Effekt deutlich ausgeprägter als für Teverelix und führt dazu, dass nach 28 Tagen bis zu dreimal so viel Peptid freigesetzt wird wie im gleichen Zeitraum aus der korrespondierenden Peptid-Referenz. Der Anstieg der im äußeren Liberationsgefäß detektierten Peptidmenge erscheint dabei über den gesamten Zeitraum annähernd linear zu erfolgen.

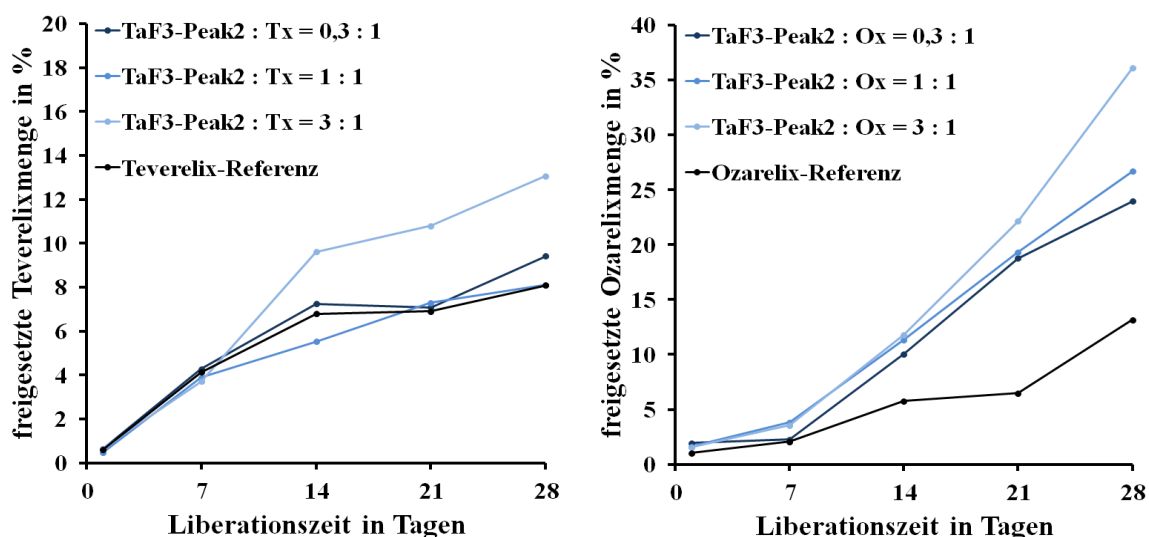


Abb. 215: Dialyseliberationskurven von Teverelix- (links) bzw. Ozarelix-Formulierungen (rechts) mit der Teilfraktion TaF3-Peak2 bei pH 7,0 über einen Zeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexpartner im Ansatz)

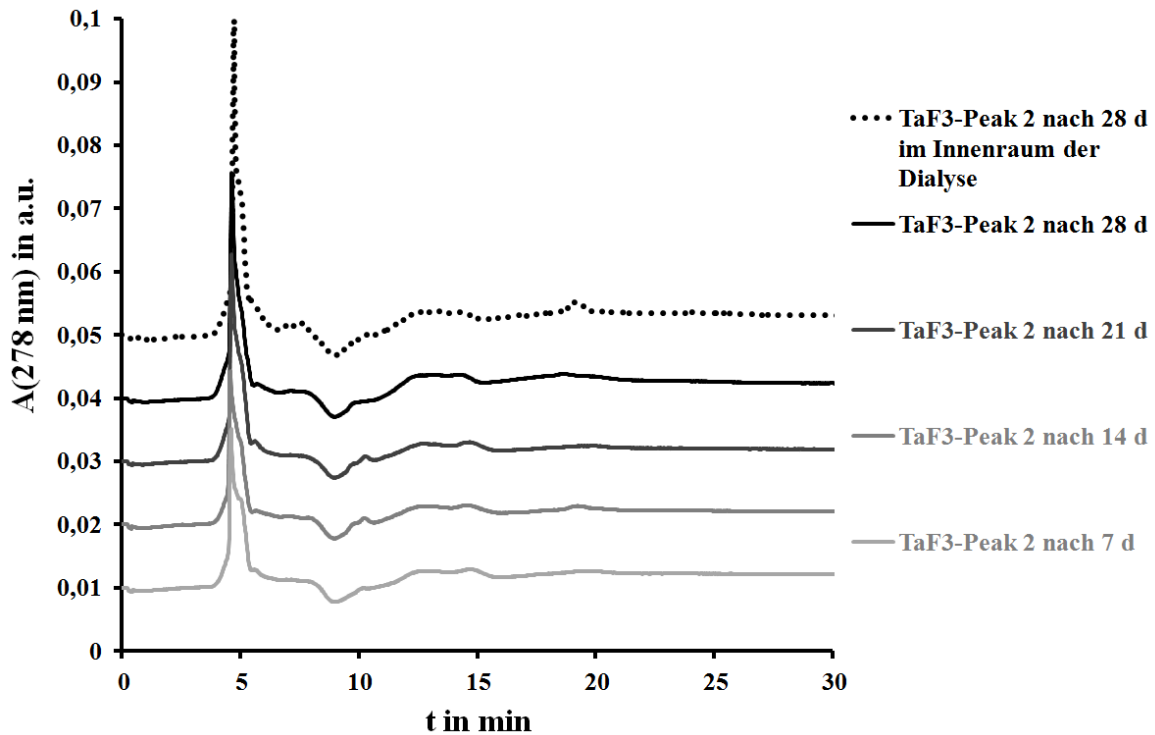


Abb. 216: HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von TaF3-Peak2 bei pH 7,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Libervationsgefäß zu verschiedenen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Libervationsgefäß nach Ende des Experimentes

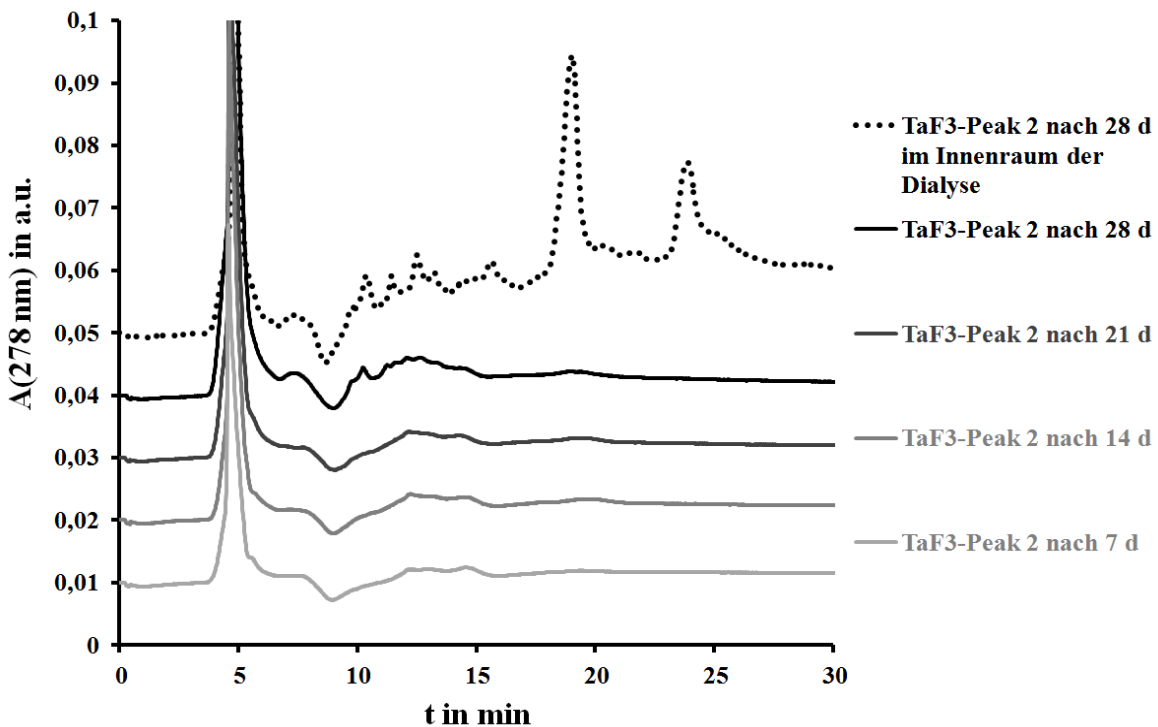


Abb. 217: HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von TaF3-Peak2 aus Komplexen mit Ozarelix bei pH 7,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Libervationsgefäß zu verschiedenen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Libervationsgefäß nach Ende des Experimentes

Ein Vergleich der HPLC-Chromatogramme mit bzw. ohne GnRH-Antagonist über den Versuchszeitraum ist anhand von Abb. 216 und Abb. 217 möglich. Wie schon in den Messreihen bei pH 5,0 ist auch bei pH 7,0 zu konstatieren, dass in Gegenwart des Peptides nach 28 Tagen im inneren Liberationsgefäß Peaks nachweisbar sind, welche in den peptidfreien Messreihen nicht auftreten und offenkundig an einer Mambranpassage gehindert werden.

4.5.4.2 Freisetzungsexperimente mit den Teilfraktionen der Tanninfraktion TaF4

Tanninfraktion TaF4 und deren Teilfraktionen erweisen sich in den Kongorotitrationen von Abschnitt 4.4.3 als sehr wirkungsvolle Inhibitoren der Amyloidbildung, was eine Untersuchung des Dialyseliberationsverhaltens von GnRH-Antagonist-Komplexen mit diesen Partnermolekülen nahelegt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden solchartige Komplexe mit Cetrorelix und Ozarelix vergleichend betrachtet. Da sich die einzelnen Teilfraktionen recht ähnlich auf das Liberationsverhalten auswirken, dient die Teilfraktion TaF4_Peak2 als Beispiel für die Ergebnisdarstellung. Das vollständige Set der Dialyseliberationskurven ist von der Anhang-DVD unter "Dialyseliberation" abrufbar. Weiterhin erfolgt keine explizite Darstellung der korrespondierenden Tanninfreisetzung, da in allen Fällen nur recht intensitätsschwache Peaks erkennbar sind. Die entsprechenden HPLC-Chromatogramme können jedoch der Anhang-DVD unter "Tanninfreisetzung_Dialyseliberation/Teilfraktionen_TaF4" entnommen werden.

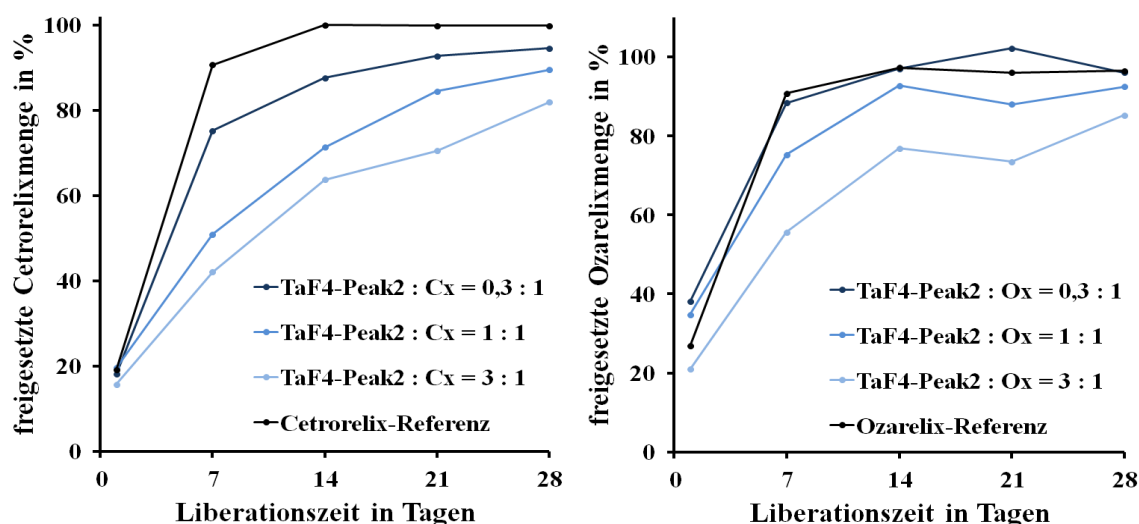


Abb. 218: Dialyseliberationskurven von Cetrorelix- (links) bzw. Ozarelix-Formulierungen (rechts) mit der Teilfraktion TaF4-Peak2 bei pH 3,0 über einen Zeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexpartner im Ansatz)

Abb. 218 zeigt die exemplarischen Kurven für die Peptidfreisetzung aus Cetorelix- bzw. Ozarelix-Komplexen bei pH 3,0. Für beide GnRH-Antagonisten wird ein Retardeffekt beobachtet, der umso stärker ausfällt, je höher der Tanninanteil im Komplex ist. Mit einer finalen Freisetzung von 80 % des Wirkstoffes in den jeweiligen Komplexen mit dem höchsten Tanninanteil fällt der Retardeffekt jedoch leicht schwächer aus, als im vorhergehenden Abschnitt für Teilfraktionen der Tanninfraktionen TaF3 als Komplexpartner beschrieben. In den Messreihen bei pH 5,0 und pH 7,0 wird in keinem Fall eine nennenswerte Beeinflussung des Liberationsverhaltens der GnRH-Antagonisten ermittelt, was in Abb. 219 anhand entsprechender Komplexe mit Ozarelix verdeutlicht wird.

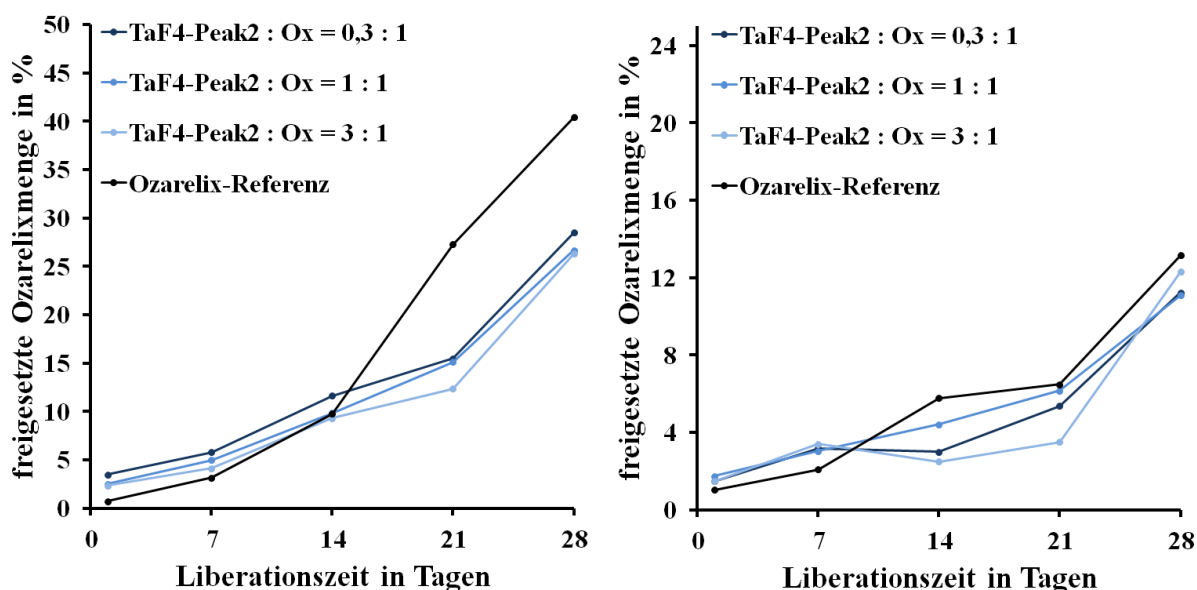


Abb. 219: Dialyseliberationskurven von Ozarelix-Formulierungen mit der Teilfraktion TaF4-Peak2 bei pH 5,0 (links) bzw. pH 7,0 (rechts) über einen Zeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexpartner im Ansatz)

4.5.5 Liberationsexperimente mit kovalent und nicht-kovalent verbundenen Systemen aus Chitosan und Tanninspezies

4.5.5.1 Freisetzungsexperimente mit nicht-kovalent verbundenen Systemen

Es wurden nicht-kovalent verbundene Systeme aus den finalen Tanninspezies 3GG, 4GG und PGG, sowie der ungetrennten Gallotanninmischung jeweils mit Chitosan 1 (DA = 19 %), Chitosan 2 (DA = 29 %) und Chitosan 3 (DA = 44 %) als Komplexpartner für Cetorelix generiert und pH-abhängig liberiert. Details zur Herstellung der unterschiedlich stark N-acetylierten Chitosane und zur Bestimmung des DA können Abschnitt 3.18 entnommen

werden. Die erhaltenen Ergebnisse ähneln sich jedoch sehr stark, weshalb an dieser Stelle im wesentlichen eine exemplarische Darstellung der Resultate anhand der Systeme mit 3GG erfolgen soll. Die übrigen Liberationskurven und Chromatogramme sind auf der Anhang-DVD unter "Dialyseliberation" und unter "Tanninfreisetzung_Dialyseliberation" hinterlegt. Für pH 3 sind die Kurven der zeitabhängigen Cetorelix-Freisetzung einerseits für die nicht-kovalenten Formulierungen von 3GG mit den genannten Chitosanen und andererseits für die analogen Systeme mit der ungetrennten Gallotanninmischung in Abb. 220 visualisiert.

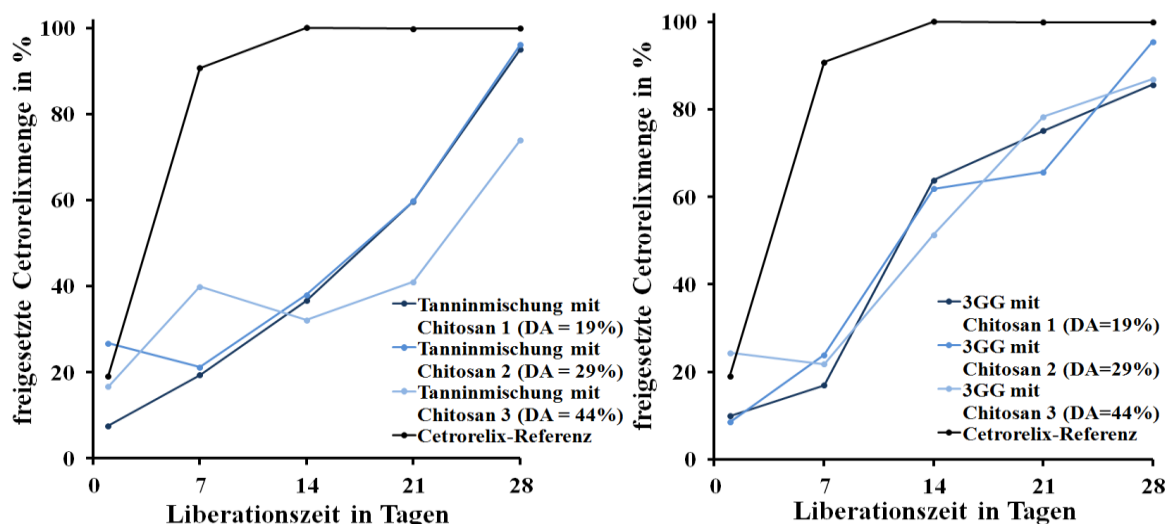


Abb. 220: Dialyseliberationskurven von Cetorelix-Formulierungen mit nicht-kovalent verbundenen Systemen aus der ungetrennten Gallotanninmischung (links) bzw. 3GG (rechts) und den unterschiedlich stark N-acetylierten Chitosanen 1-3 bei pH 3,0

Gegenüber der Cetorelix-Referenz wird bei pH 3,0 die Freisetzungsgeschwindigkeit, nicht aber die final freigesetzte Gesamtmenge des Peptides deutlich reduziert, sodass über den gesamten Liberationszeitraum von 4 Wochen stets ein annähernd lineares Profil sichtbar wird. Der N-Acetylierungsgrad des Chitosans oder die konkret verwendete Tanninspezies beeinflusst den Kurvenverlauf hingegen nicht signifikant.

Bei pH 5,0 und pH 7,0 konnte in Gegenwart der nicht-kovalent verbundenen Tannin-Chitosan-Systeme in keinem Fall eine signifikant vom Referenzverhalten abweichende Freisetzungskinetik verzeichnet werden. Exemplarisch sind hierfür in Abb. 221 die entsprechenden Kurvenverläufe für die Systeme mit 3GG dargestellt.

Betrachtet man die korrespondierend aufgenommenen HPLC-Chromatogramme der zeitabhängig freigesetzten Tanninspezies, so ist festzustellen, dass analog zu den in Abschnitt 4.5.3.2 besprochenen Resultaten unter Verwendung der freien Tanninspezies eine rasche Freisetzung dieser Spezies auch aus den nicht-kovalenten Systemen erfolgt und

anschließend zunehmend Hydrolyseprodukte detektiert werden. Als Beispiel werden erneut die entsprechenden Ergebnisse für 3GG-haltige Formulierungen bei pH 3 in Abb. 222 gezeigt.

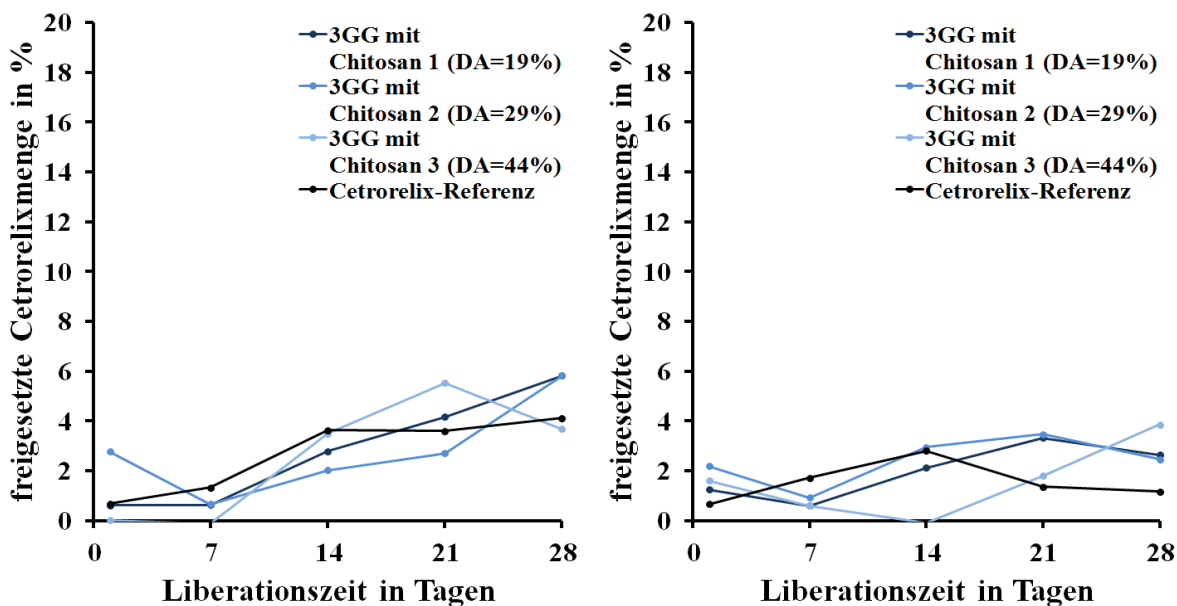


Abb. 221: Dialyseliberationskurven von Cetrorelix-Formulierungen mit nicht-kovalent verbundenen Systemen aus 3GG und den unterschiedlich stark N-acetylierten Chitosanen 1-3 bei pH 5,0 (links) bzw. pH 7,0 (rechts)

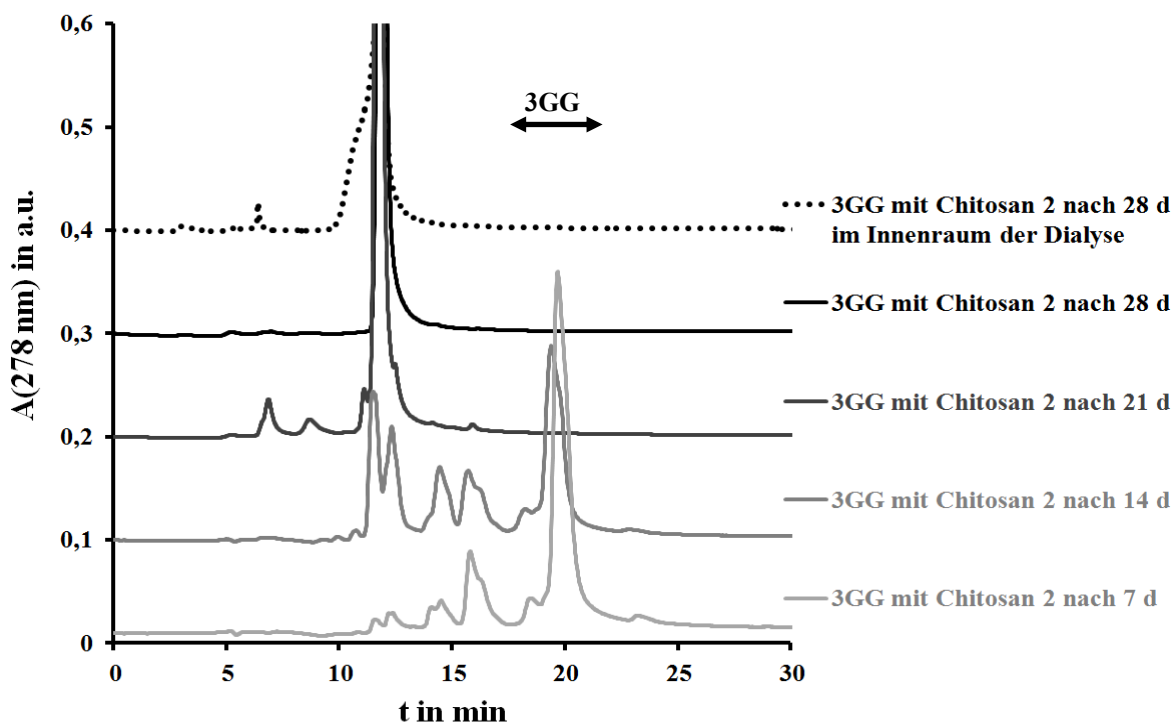


Abb. 222: HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von Komplexen aus nicht-kovalenten Systemen von 3GG mit Chitosan 2 (DA = 29 %) mit Cetrorelix bei pH 3,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Liberationsgefäß zu verschiedenen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramm stammt aus dem inneren Liberationsgefäß nach Ende des Experimentes (3GG-Peak bei 19,8 min)

4.5.5.2 Freisetzungsexperimente mit kovalent verbundenen Systemen

In der Masterarbeit von B.Sc. P. Körner [Körner, 2015] wurde im Rahmen des vorliegenden Projektes ein Verfahren zur kovalenten Anbindung von Tanninspezies an Chitosan entwickelt. Zu diesem Zweck erfolgt zunächst eine N-Succinylierung des Chitosans mithilfe von Bernsteinsäureanhydrid gemäß Abschnitt 3.19.1 und anschließend eine Anbindung der Tanninspezies an den eingebrachten Succinyl-Linker mittels EDC/HOBt gemäß Abschnitt 3.19.2. Unter Verwendung von reiner PGG als konkrete Tanninspezies wurden dabei die drei Polymermaterialien TaNSCS 1, TaNSCS 2 und TaNSCS 3 synthetisiert, welche aufgrund der jeweils eingesetzten Menge an EDC/HOBt von 100 mol-%, 60 mol-% bzw. 20 mol-% einen systematisch abnehmenden Tanninylierungsgrad aufweisen, der von P. Körner zwar semiquantitativ über ATR-FTIR-Spektroskopie nachgewiesen, jedoch nicht exakt beziffert werden konnte. Für nähere Informationen zu Synthese und Charakterisierung dieser neuartigen Verbindungen sei auf die Masterarbeit von KÖRNER, 2015 verwiesen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird jedoch das Freisetzungsverhalten von Formulierungen aus Cetorelix und TaNSCS 1, TaNSCS 2 bzw. TaNSCS 3 untersucht.

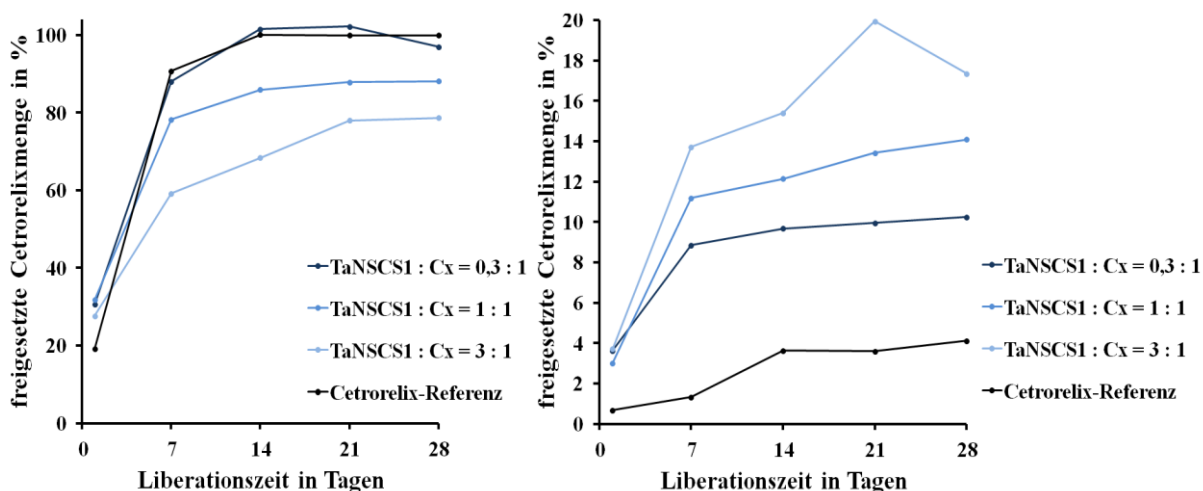


Abb. 223: Dialyseliberationskurven von Cetorelix-Formulierungen mit TaNSCS 1 in Abhängigkeit vom Massenverhältnis von Partnermolekül zu Peptid bei pH 3,0 (links) bzw. pH 5,0 (rechts)

In Abb. 223 ist die zeitabhängige Cetorelix-Freisetzung aus Formulierungen mit der am stärksten tanninylierten Verbindung TaNSCS 1 bei pH 3,0 und pH 5,0 in Abhängigkeit vom Massenverhältnis zwischen Partnermolekül und Peptid dargestellt. Bei pH 3,0 wird die in der Referenz zu beobachtende schnelle Freisetzung des GnRH-Antagonisten mit steigendem Massenanteil an TaNSCS 1 zunehmend verzögert. Bei pH 5,0 wird demgegenüber ein

vollständig anderes Verhalten registriert. Unter diesen pH-Bedingungen wird die infolge der einsetzenden Peptidaggregation stark verringerte Freisetzung der Peptid-Referenz in Gegenwart von TaNSCS 1 drastisch erhöht, wobei ein höherer Massenanteil an eingesetztem Partnermolekül gleichsam mit einer Steigerung der Wirkstofffreisetzung einhergeht.

Während die für pH 3,0 und pH 5,0 ermittelten Kurvenverläufe in Gegenwart von TaNSCS 2 annähernd deckungsgleich zu dem besprochenen Verhalten der Formulierungen mit TaNSCS 1 ausfallen, zeigen sich bei Verwendung der am geringsten tanninylierten Verbindung TaNSCS 3 gewisse Unterschiede, wie in Abb. 224 zu sehen. Durch die Gegenwart von TaNSCS 3 wird zwar wiederum bei pH 3,0 eine systematische Reduktion und bei pH 5,0 eine entsprechende Steigerung der Peptidfreisetzung bewirkt. Eine signifikante Abhängigkeit vom verwendeten Massenverhältnis zwischen Partnermolekül und GnRH-Antagonist lässt sich nicht belegen.

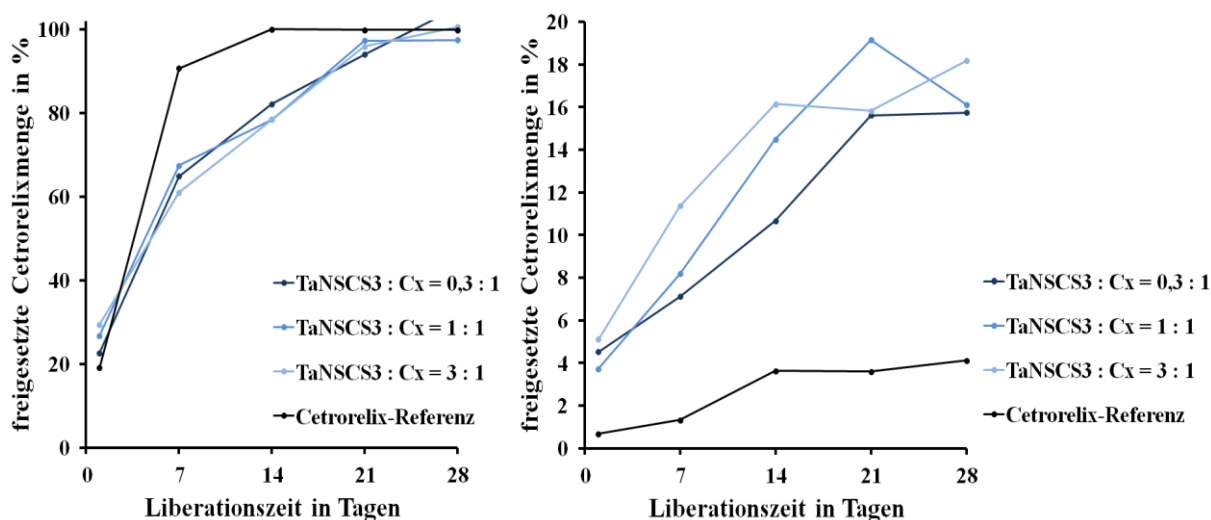


Abb. 224: Dialyseliberationskurven von Cetrorelix-Formulierungen mit TaNSCS 3 in Abhängigkeit vom Massenverhältnis von Partnermolekül zu Peptid bei pH 3,0 (links) bzw. pH 5,0 (rechts)

Die Beeinflussung der Peptidfreisetzung bei pH 7,0 folgt denselben Trends, die auch bei pH 5,0 auftreten. Erneut verhalten sich Formulierungen mit TaNSCS 1 und TaNSCS 2 ähnlich. Als Beispiel sind in Abb. 225 die Kurvenverläufe in Gegenwart von TaNSCS 2 wiedergegeben. Mit steigendem Massenverhältnis von Partnermolekül zu Cetrorelix wird eine zunehmende Freisetzungssteigerung bezogen auf das Peptid hervorgerufen. Das in derselben Abbildung veranschaulichte Verhalten in Gegenwart von TaNSCS 3 unterscheidet sich insoweit, als dass keine systematische Abhängigkeit vom eingesetzten Massenverhältnis beider Komponenten zueinander auftritt.

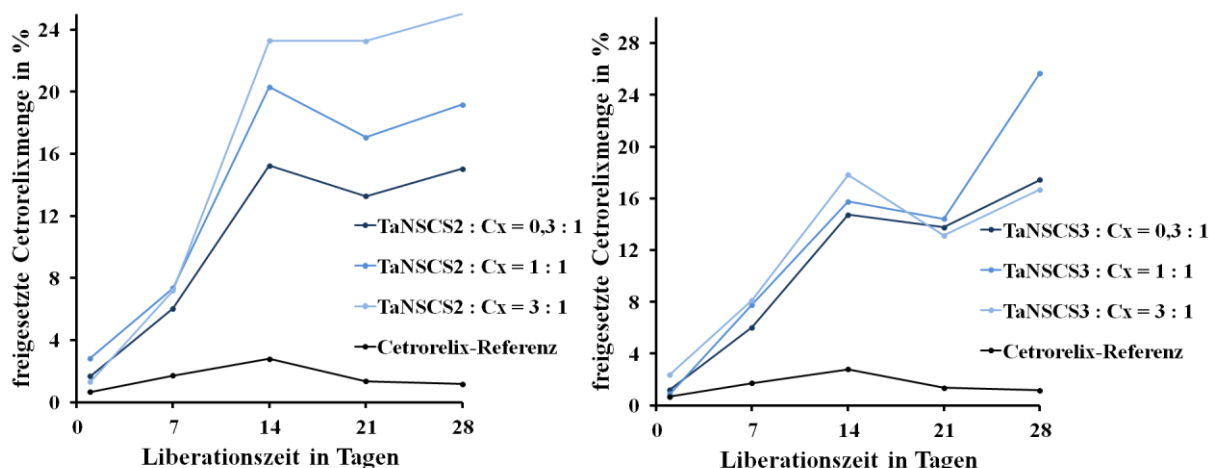


Abb. 225: Dialyseliberationskurven von Cetorelix-Komplexen mit TaNSCS 2 (links) bzw. TaNSCS 3 (rechts) in Abhängigkeit vom Massenverhältnis von Partnermolekül zu Peptid bei pH 7,0

In Hinblick auf die korrespondierenden Untersuchungen der zeitabhängigen Freisetzung von Tanninspezies aus diesen Formulierungen sind in Abb. 226 exemplarisch die entsprechenden HPLC-Chromatogramme für Formulierungen aus TaNSCS 1 und Cetorelix in einem Massenverhältnis von 3 : 1 bei pH 3,0 angegeben. Offenkundig wird ausschließlich Gallussäure, welche bei einer Retentionszeit von ca. 12,4 min eluiert wird, schrittweise in das äußere Liberationsgefäß überführt, größere Galloylglukosen hingegen nicht.

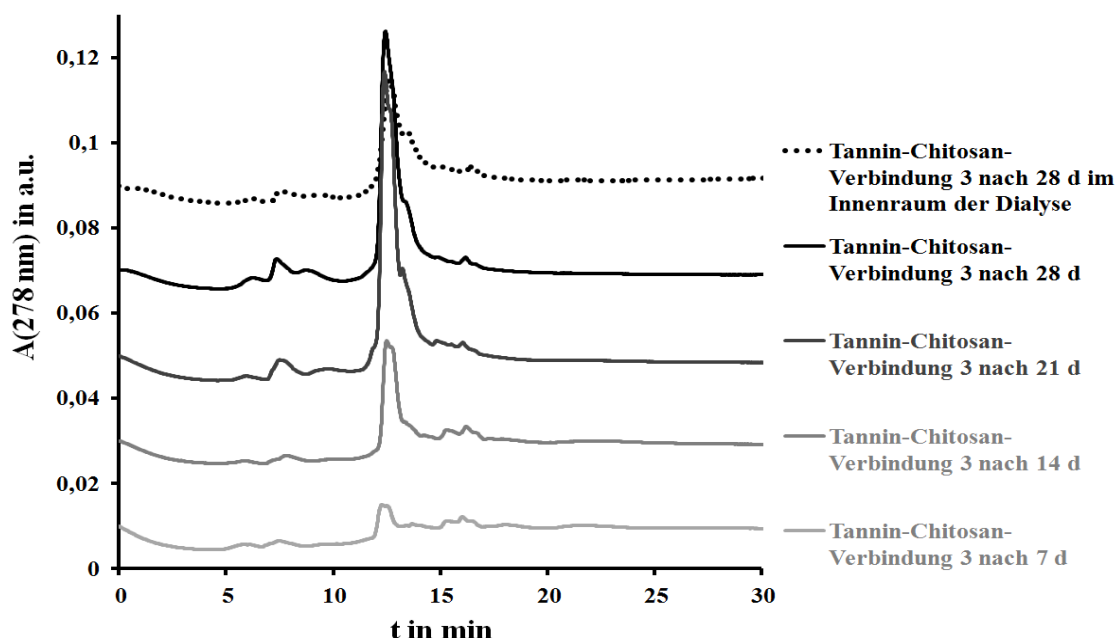


Abb. 226: HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von Komplexen aus Cetorelix und TaNSCS 1 bei pH 3,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Liberationsgefäß zu verschiedenen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Liberationsgefäß nach Ende des Experimentes (Gallussäure-Peak bei 12,4 min)

5 Diskussion

5.1 Aggregation von GnRH-Antagonisten und des GHRH-Analogons

5.1.1 Monomerkonformationen von GnRH-Antagonisten

Die Aggregation von GnRH-Antagonisten verläuft in einem hochgeordneten, mehrstufigen Prozess, welcher bereits in seinen Anfangsstadien durch eine intensive Ausbildung von β -Faltblattstrukturen begleitet wird, was bereits in der vorangegangenen Masterarbeit gezeigt werden konnte [Beil, 2012(1)]. Um die strukturellen Ursachen für diesen Prozess und die Abläufe zu Beginn der Assoziation verstehen zu können, ist es daher unabdingbar, eine Vorstellung von der Monomerkonformation dieser Peptide und ihrer Interaktion miteinander zu gewinnen.

Bereits MÜLLER ET AL., 1994 unternahmen Anstrengungen zur NMR-spektroskopischen Aufklärung der Monomerkonformation von Cetrorelix. Da die Aggregation dieses Peptides in wässrigen Solventien schon bei sehr niedrigen Peptidkonzentrationen eintritt, ist es nicht möglich, eine ausreichend hohe Konzentration des Monomers unter annähernd physiologischen Solvensbedingungen zu erreichen, um eine NMR-Untersuchung unter solchen Bedingungen durchführen zu können. Stattdessen studierten sie das Verhalten des Peptides in unpolarer Umgebung, wobei sie in keinem der verwendeten Lösemittel eine Vorzugsstruktur identifizieren konnten. Speziell die Strukturermittlung in DMSO- d_6 scheiterte daran, dass MÜLLER ET AL., 1994 keine *long-range* Kontakte detektieren konnten. In anderen Solventien erkannten sie hingegen eine große Anzahl nicht mit einer einzigen Struktur erklärbarer Kontakte und schlussfolgerten, dass monomeres Cetrorelix in Lösung keine Vorzugsstruktur hat. Dieser Befund bewirkte, dass für alle in der Folge unternommenen Versuche, das Aggregationsverhalten mittels *Molecular Modelling* zu simulieren, nicht von einer bestimmten Monomerstruktur ausgegangen, sondern vielmehr mit enormem Aufwand zunächst Zufallskonformationen für Cetrorelix-Monomere berechnet und daraus mittels statistischer Selektion ein ganzes Set an potentiell infrage kommenden Monomerkonformationen für alle weiteren Schritte herangezogen werden musste, wodurch der Rechenaufwand immens vergrößert und die zu erreichende Aussagekraft der Ergebnisse beeinträchtigt wurde [Rattei, 2002; Lang, 2005; Schneider, 2014].

DMSO- d_6 ist jedoch in vielen Fällen ein bevorzugtes Solvens für die NMR-Strukturaufklärung von Proteinen und Peptiden, da es einerseits aufgrund seiner aprotischen

Natur eine Untersuchung der labilen NH-Protonen zulässt und andererseits hervorragend geeignet ist, um die hydrophobe Umgebung eines membranständigen Rezeptors oder, wie im vorliegenden Fall, die unmittelbare Umgebung eines hydrophoben Peptidaggregates zu beschreiben [Pappa et al., 2010]. Zahlreiche Studien belegen zudem, dass DMSO als Cosolvens in wässrigen Systemen zwar eine konzentrationsabhängige Denaturierung und damit eine Veränderung des Faltungszustandes hervorruft, wie es zur Verhinderung der Aggregation von GnRH-Antagonisten erforderlich ist, dabei jedoch analog zu Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid keine ungeordnete Entfaltung generiert, sondern vielmehr einem reversiblen Pfad folgt [Kotik et al., 1995]. Dadurch ist es dennoch möglich, aus einer DMSO-d₆ ermittelten Struktur, Rückschlüsse auf die Bedingungen zu Beginn der Aggregation zu ziehen.

PAPPA ET AL., 2010 gelang es diesbezüglich, die Konformationen einer Reihe an Derivaten des GnRH-Agonisten Leuprolid in DMSO-d₆ aufzuklären, wobei sie besonderes Augenmerk auf die Optimierung der für die Aufnahme der NOESY-Spektren verwendeten *mixing time* τ_m legten, um möglichst viele *long-range* Kontakte bei gleichzeitiger Vermeidung von 3-Spin-Effekten detektieren zu können. Da sich insbesondere auch durch die Entwicklung des ATNOS-Programms (vgl. Abschnitt 1.3.3) darüber hinaus innerhalb der letzten 20 Jahre die Möglichkeiten zur Auswertung schwacher NOESY-Kreuzpeaks deutlich verbessert haben, erschien ein erneuter Versuch einer 3D-Strukturbestimmung von GnRH-Antagonisten in DMSO-d₆ durchaus als vielversprechend.

Die in Abschnitt 4.1.4 dargestellten Ergebnisse demonstrieren, dass für alle untersuchten GnRH-Antagonisten in DMSO-d₆ bzw. Mischungen aus DMSO-d₆ und D₂O eine hinreichende Anzahl an *medium-range*- und *long-range*-Kontakten bestimmt werden kann, um daraus wesentliche strukturelle Charakteristika der korrespondierenden Monomerkonformationen zu gewinnen. Für Cetrorelix-Acetat ergibt sich in DMSO-d₆ eine Konformation, welche durch zwei gestreckte Sequenzabschnitte gekennzeichnet ist, die durch eine Krümmung im Bereich des Tyr⁵-Restes voneinander separiert werden (vgl. Abb. 64). Die Krümmung des Peptidrückgrates selbst wird in diesem Fall durch eine Seitenketteninteraktion zwischen D-Pal(3)³ und D-Cit⁶ stabilisiert. Beim schrittweisen Übergang zu stärker wässrigen Systemen mit DMSO-d₆/D₂O-Verhältnissen von 70/30 bzw. 45/55 (v/v) bleibt diese Grundstruktur erhalten (vgl. Abb. 69 & Abb. 73). Die beiden gestreckten Sequenzabschnitte werden lediglich durch zunehmende hydrophobe Seitenketten-Interaktionen zwischen Ac-D-Nal(2)¹ und einer Reihe an Aminosäureresten im C-terminal von der Rückgratkrümmung lokalisierten Sequenzabschnitt näher zusammen gezogen, sodass der Winkel der

Krümmung mit steigendem D₂O-Gehalt kleiner wird. Es ist daher anzunehmen, dass eine ähnliche Struktur auch unter physiologischen Bedingungen vorliegt, auch wenn diese aufgrund der starken Aggregationstendenz selbst nicht für eine entsprechende Messung zugänglich ist (vgl. Abb. 227).

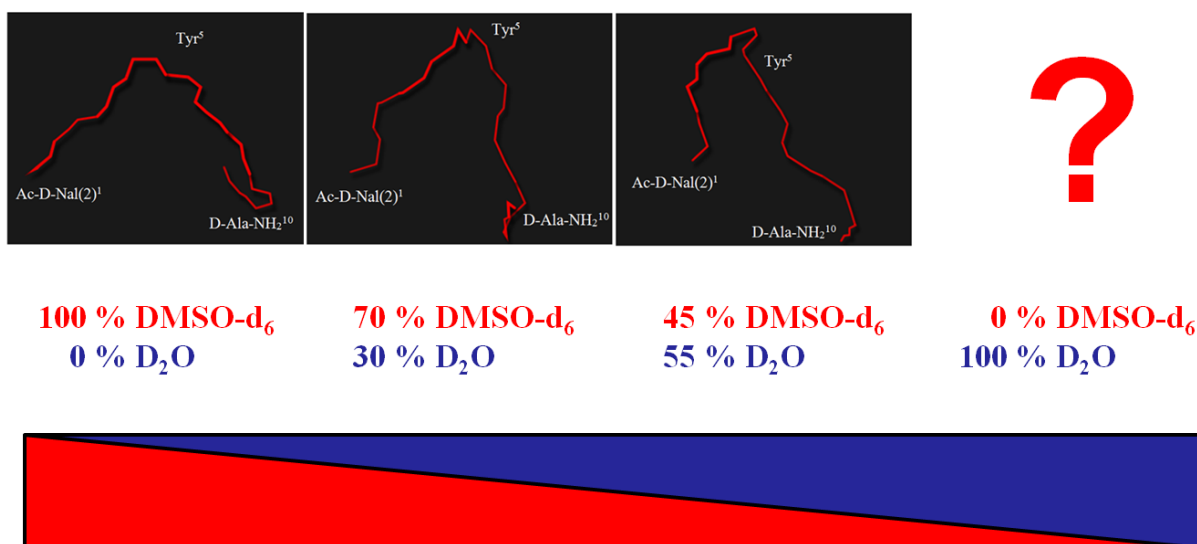


Abb. 227: Veranschaulichung der Veränderung der NMR-spektroskopisch ermittelten Monomerkonformation von Cetrorelix in Abhängigkeit vom D₂O-Anteil; in reinem D₂O verhindert die starke Aggregationsneigung eine Analyse, weshalb lediglich eine Extrapolation der zu erwartenden Struktur denkbar ist

Anhand des GnRH-Antagonisten Teverelix lässt sich der Einfluss des Protonierungszustandes der Aminosäure D-Pal(3)³ auf die Monomerkonformation exemplarisch betrachten. Wie in Abschnitt 4.1.4.3 dargestellt, liegt die genannte Aminosäure in der Probe des Teverelix-Acetates deprotoniert und daher ungeladen vor, wohingegen sie in der Probe des korrespondierenden Trifluoracetates protoniert und somit positiv geladen vorliegt. Die deprotonierte Variante zeigt eine analoge Konformation wie die entsprechende Cetrorelix-Struktur, bestehend aus zwei durch eine Rückgrat-Krümmung voneinander getrennten, ausgestreckten Sequenzabschnitten. Im Gegensatz dazu wird das Peptid bei Protonierung von D-Pal(3)³ in eine helikale Konformation gezwungen (vgl. Abb. 78). Der pK_S-Wert dieses Aminosäurerestes ist bisher in der Literatur experimentell nicht ermittelt worden, jedoch ergeben aktuelle quantenchemische Rechnungen einen theoretischen Wert von 3,85 [SwissSideChain, 2015]. In genau diesem pH-Bereich zeigen die ATR-FTIR-spektroskopischen Messungen einen Bruch im Aggregationsverhalten von Teverelix, aber auch im Verhalten von Cetrorelix und Ozarelix (vgl. Abschnitt 4.1.1.3). Während oberhalb

des genannten pH-Wertes eine intensive Aggregation anhand der Ausbildung eines hohen β -Faltblattgehaltes festzustellen ist, treten unterhalb dieses pH-Wertes kaum aggregationstypische Charakteristika auf. Es ist daher zu konstatieren, dass eine Korrelation zwischen den beiden drastisch unterschiedlichen Monomerkonformationen und dem korrespondierend unterschiedlichen Aggregationsverhalten besteht, wobei das verbindende Element im Protonierungszustand von D-Pal(3)³ zu finden ist.

Ozarelix stellt im Rahmen der vorliegenden Arbeit den einzigen Vertreter der 4. Generation von GnRH-Antagonisten dar und weist daher im Unterschied zu den beiden anderen GnRH-Antagonisten eine Rückgratmethylierung am Peptidstickstoff der Aminosäure in Position 5 der Sequenz auf. Wie die NMR-Untersuchungen in Abschnitt 4.1.4.2 gezeigt, hat dies zur Folge, dass ein Gemisch aus Monomeren mit einer *cis*- bzw. einer *trans*-Konfiguration im Verhältnis 1 : 3 bezogen auf die entsprechende Peptidbindung vorliegt.

Im Allgemeinen ist die *trans*-Konfiguration der Peptidbindung sterisch und energetisch gegenüber der *cis*-Variante stark begünstigt, sodass für die meisten Kombinationen von Aminosäure-Resten der resultierende energetische Unterschied 2,5 kcal/mol zu Gunsten der *trans*-Variante beträgt [Pal & Chakrabarti, 1999]. Diese Differenz wird aber deutlich geringer, wenn der Peptidstickstoff anstelle eines Protons eine sterisch anspruchsvolle Gruppierung trägt. Unter den klassischen proteinogenen Aminosäuren ist dies ausschließlich für Prolin der Fall, weshalb *cis/trans*-Isomeren von Peptidbindungen besonders intensiv an diesem Beispiel erforscht sind. Im Falle einer solchen Peptidbindung zu Prolin beträgt der energetische Unterschied zwischen den Konformationen nur noch 0,5 kcal/mol [Maigret et al., 1970], was die Wahrscheinlichkeit für die *cis*-Konformation deutlich erhöht. Statistische Auswertungen der in den einschlägigen Datenbanken abgelegten Proteinstrukturen verdeutlichen diese Sonderstellung von Prolin daran, dass nur etwa 0,03 - 0,05 % aller Peptidbindungen, die nicht mit der Aminogruppe eines Prolyl-Restes verbunden sind, in der *cis*-Konfiguration auftreten, demgegenüber jedoch 5 - 9 % der mit Prolyl-Resten verbundenen Peptidbindungen [Zhang & Germann, 2011]. Es ist daher plausibel, dass die eingebrachte Rückgratmethylierung ebenfalls zu einer Reduktion der Energiebarriere zwischen *trans*- und *cis*-Konfiguration der betroffenen Peptidbindung von Ozarelix führt und daher eine solche Isomerisierung speziell unter den harschen pH-Bedingungen während der Schutzgruppenabspaltung im Zuge der Peptidsynthese erfolgen kann.

Die für beide Konfigurationen separat durchgeführte Strukturberechnung verweist auf einen massiven Unterschied zwischen den jeweils resultierenden Konformationen. Während die unerwünschte *cis*-Variante von Ozarelix eine Konformation einnimmt, die in hohem Maße

mit den bestimmten Strukturen für Teverelix- und Cetorelix-Acetat übereinstimmt, bildet die *trans*-Variante eine eher helikale Struktur aus (vgl. Abb. 75). Selbstredend wurden alle bisher experimentell ermittelten Daten stets mit der 3:1-Mischung beider Ozarelix-Isomere gewonnen, sodass eine Zuordnung der entsprechenden Befunde auf die einzelnen Isomere nicht zweifelsfrei erfolgen kann und weiterer Analysen mit möglichst isomerenreinen Verbindungen bedarf. Allerdings ist es bemerkenswert, dass beispielsweise die kritische Aggregatbildungskonzentration *cac* sowohl unter Nutzung intrinsischer und extrinsischer Fluoreszenzspektroskopie [Lang, 2005; Schneider et al., 2010], als auch mittels Schwingquarzmethode [Kick, 2007] und auch mithilfe massenspektrometrischer Methoden [Hempelt, 2012] für Ozarelix bei einer etwa viermal so hohen Peptidkonzentration wie für Cetorelix oder Teverelix ermittelt wird. Es ist selbstredend denkbar, dass diese verringerte Aggregationstendenz auf die grundsätzlich erschwerte Zusammenlagerung von Rückgrat-arealen durch die bei Ozarelix vorhandene Rückgratmethylierung zurückzuführen ist. Gleichsam korreliert der genannte Unterschied der *cac*-Werte aber auffallend mit dem Anteil an *cis*-Isomeren in der Ozarelix-Isomerenmischung, sodass auch plausibel erscheint, dass vorrangig das *cis*-Isomer für die festzustellende Aggregation verantwortlich ist, was wiederum eine Korrelation der Cetorelix-typischen Monomerkonformation dieser *cis*-Variante mit deren Aggregationspotential implizieren würde. Aus dieser Überlegung folgt die These, dass die *cac* des *cis*-Isomers allein annähernd derjenigen von Teverelix und Cetorelix entsprechen müsste, diejenige des *trans*-Isomers aber bei deutlich höheren Werten zu erwarten wäre. Eine Überprüfung übersteigt jedoch die Möglichkeiten der vorliegenden Arbeit, da hierfür isomerenreine Verbindungen unabdingbar sind.

5.1.2 Initiale Schritte der Aggregatbildung von GnRH-Antagonisten und Ausbildung der amyloid-typischen Sekundärstruktur

Das hervorstechende Charakteristikum der Aggregation von GnRH-Antagonisten besteht in der Ausbildung der amyloid-typischen β -Faltblattstrukturen, die einerseits das fibrilläre Erscheinungsbild und andererseits die hohe Stabilität der gebildeten Aggregate bestimmen. Es ist daher von Interesse, wie diese β -Faltblattstrukturen initial entstehen und welche Sequenzabschnitte daran beteiligt sind.

Da bereits in vorhergehenden Arbeiten anhand der Amid I-Bande von Cetorelix- und Ozarelix-Aggregaten abgeleitet wurde, dass es sich hierbei um parallele β -Faltblattstrukturen handelt [Beil, 2012(1)], was auch bei anderen amyloiden Strukturen die präferierte

Ausrichtung in fibrillären Strukturen ist [Sipe, 2005], kann eine Analyse der Sekundärstrukturverteilungen von Aggregaten unterschiedlich langer, N-terminaler Cetrorelix-Fragmente Hinweise auf die Lokalisierung der β -Faltblattareale innerhalb der Sequenz des vollständigen Peptides geben.

Das kürzeste, im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Cetrorelix-Fragment Cx[1-4] bildet ein Aggregat, welches annähernd exklusiv aus β -Faltblattstrukturen besteht (vgl. Abb. 23). Dieser Befund ist insoweit erstaunlich, als dass die Sequenz Ac-D-Nal(2)¹-D-Phe(4Cl)²-D-Pal(3)³-Ser⁴, welche in allen drei betrachteten GnRH-Antagonisten identisch vorkommt, extrem hydrophob erscheint und daher eine von polaren Wechselwirkungen dominierte Aggregatstruktur für dieses Fragment verdeutlicht, dass unpolare Wechselwirkungen für den Prozess der Aggregation von Bedeutung sein mögen, die letztendlich resultierende Stabilisierung der Aggregatstruktur jedoch vorwiegend auf polaren Wechselwirkungen, insbesondere auf Wasserstoffbrückenbindungen fußt. Aufgrund der geringen Länge dieses Fragmentes können zudem die strukturelevanten Wasserstoffbrückenbindungen nur intermolekular erklärt werden, sodass die für diesen Abschnitt bestimmte Sekundärstruktur nur durch eine intermolekulare Anordnung dieser Peptide in durchgehenden, parallelen β -Faltblattstrukturen von Ac-D-Nal(2)¹ bis Ser⁴ zu erklären ist.

Wie in Abschnitt 4.1.1.1 dargelegt, wird bereits für das Fragment Cx[1-6] ein zusätzlicher β -Faltblattanteil detektiert, der sich aufgrund der veränderten Bandenlage von der β -Faltblattstruktur des N-terminalen Segmentes unterscheiden lässt. Diese in der vorliegenden Arbeit als Typ 2 bezeichnete Faltblattstruktur nimmt im Fragment Cx[1-9] einen noch größeren Anteil ein, was darauf hindeutet, dass auf der C-terminalen Seite des Tyr⁵-Restes ein neues, paralleles β -Faltblatt begonnen wird. Die Ursache für die Trennung beider β -Faltblattbereiche lässt sich anhand der Sequenz des Peptides plausibel mit den auftretenden D/L-Wechseln erklären. Bei einem klassischen, parallelen β -Faltblatt sind alle α -C-Atome so orientiert, dass die sterisch anspruchsvollen Seitenketten jeweils versetzt zueinander aus der Ebene des Faltblattes herausragen. Diese Konstellation ist spannungsfrei sowohl für eine durchgängig L-konfigurierte Peptidkette als auch für eine analoge, D-konfigurierte Peptidkette möglich. An einem D/L-Wechsel entsteht jedoch eine sterische Hinderung, welche die Fortsetzung des β -Faltblattes unterbindet.

Dementsprechend können problemlos parallele β -Faltblattstrukturen in den einheitlich konfigurierten Sequenzabschnitten Ac-D-Nal(2)¹-D-Phe(4Cl)²-D-Pal(3)³ sowie Leu⁷-Arg⁸ entstehen. Die beiden Faltblattabschnitte können jeweils unter einer gewissen Verdrillung

noch um eine anders konfigurierte Aminosäure verlängert werden (Ser⁴ bzw. D-Cit⁶), brechen dann aber zwangsläufig aufgrund der sterischen Inkompatibilität ab.

Unter der näherungsweisen Annahme, dass sich ein Sequenzabschnitt des vollständigen GnRH-Antagonisten bei der Aggregation analog zu dem entsprechenden N-terminalen Fragment verhält, lässt sich auf Basis der besprochenen Fragmentanalysen die in Tabelle 34 dargestellte Zuordnung der detektierten Sekundärstrukturmerkmale auf die einzelnen Peptidbindungen von Cetrorelix vornehmen.

Tabelle 34: Hypothetische Verteilung der Sekundärstrukturelemente in einer parallelen β -Faltblatt-Struktur von Cetrorelixaggregaten auf die einzelnen Peptidbindungen der Sequenz

Aminosäuren	Ac	D-Nal(2) ¹	D-Phe(4C) ²	D-Pal(3) ³	Ser ⁴	Tyr ⁵	D-Cit ⁶	Leu ⁷	Arg ⁸	Pro ⁹	D-Ala-NH ₂ ¹⁰
Peptidbindungen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Cetrorelix-Fragmente	Cx[1-4]										
					Cx[1-6]						
							Cx[1-9]			Cetrorelix	
hypothetische Sekundärstruktur	β	β	β	ug β	ug	β	β	β	p	ug	ug

β β -Faltblattstruktur
 ug ungeordnete Zufallsknäuelstruktur
 p prolinartige Sonderstruktur

Der Übergang von dem Cetrorelix-Fragment Cx[1-9] zum vollständigen Dekapeptid geht bei gleichbleibendem Gesamt- β -Faltblatt-Gehalt mit einer erheblichen Verschiebung zwischen den Anteilen der Typ 1 bzw Typ 2 zuzuordnenden Teilbanden der Amid I-Bande einher (vgl. Abb. 27). Damit tritt hier eine Abweichung von der getroffenen Näherung zu Tage, da sich offenkundig durch die Hinzunahme des finalen D-Ala-NH₂¹⁰-Restes ein Effekt einstellt, der auf die strukturellen Eigenschaften des vorhergehenden Fragmentabschnittes zurückwirkt. Die Ursache wird bei Betrachtung der NMR-Struktur in Abb. 67 ersichtlich. Der genannte, finale Aminosäurerest vereint eine hohe Anzahl von Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren auf engem Raum und verfügt aufgrund der strukturbrechenden Wirkung des vorhergehenden Pro⁹-Restes über eine erhebliche Flexibilität. In der NMR-spektroskopisch ermittelten Konformation ist deutlich zu sehen, dass dieser Rest auf das Peptidrückgrat am D-Cit⁶-Rest durch Wasserstoffbrücken zurückgreift und dadurch eine Spannung in das Peptidrückgrat bringt, welche zu der Veränderung der Bandenlage der korrespondierenden β -Faltblatt-Teilbande führt.

HEMPELT, 2012 konnte mittels massenspektrometrischer Untersuchungen für alle GnRH-Antagonisten eine besondere Stabilität von dimeren Untereinheiten innerhalb der Aggregate

nachweisen, sodass es möglich erscheint, wesentliche Charakteristika der Aggregatstruktur auf der Ebene eines Dimeres zu betrachten. In Hinblick auf eine Betrachtung der stabilisierenden Wechselwirkungen im Kontext der vorhandenen Sekundärstruktur scheint dieser Näherungsansatz insbesondere deshalb gerechtfertigt, weil D. Hempelt zeigen konnte, dass die detektierten dimeren Strukturen selbst im Reflektormodus eines TOF-Detektors noch zu detektieren sind, was aufgrund der dabei herrschenden Hochvakuumbedingungen eindeutig belegt, dass die Stabilisierung dieser Dimere auf solvensunabhängige Wechselwirkungen und damit mit großer Sicherheit auf Wasserstoffbrückenbindungen zurückgeht.

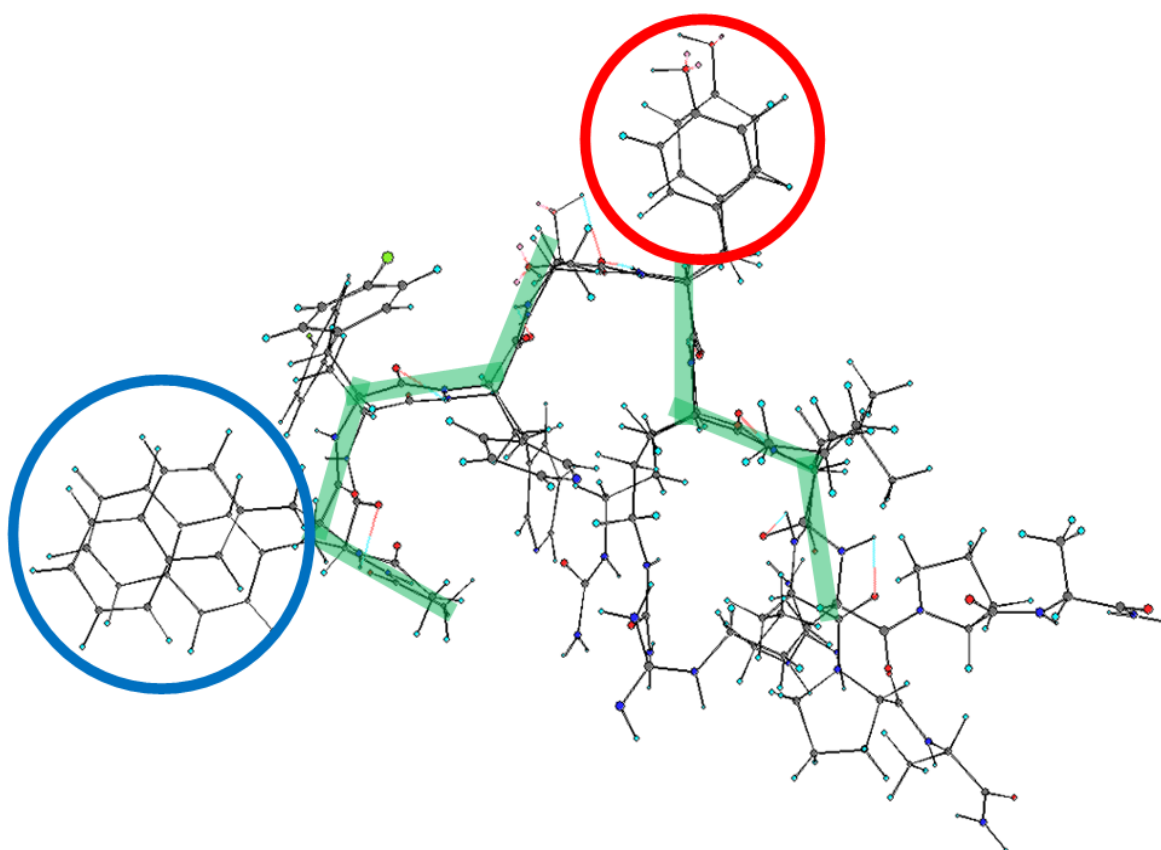


Abb. 228: Modellvorschlag für die Dimerstruktur von Cetrorelix unter Berücksichtigung der IR-spektroskopisch ermittelten Sekundärstrukturverteilung innerhalb des Aggregates (rot: Tyr⁵-Seitenketten; blau: Ac-D-Nal(2)¹-Seitenketten; grün: β -Faltblattbereiche des Peptidrückgrates; rot-blaue Linien: H-Brückenbindungen)

Auf Basis der in Tabelle 34 dargestellten Zuordnung der infrarotspektroskopisch bestimmten Sekundärstrukturelemente auf die einzelnen Peptidbindungen ist es somit möglich, eine hypothetische Dimerstruktur für Cetrorelix als Teilmodell für das Aggregat zu konstruieren, welches neben den durch die kovalente Struktur vorgegebenen Kriterien auch der

experimentell ermittelten Sekundärstrukturverteilung gerecht wird. Eine auf diesem Wege erhaltene Modellstruktur ist in Abb. 228 zu sehen.

Die Dimerstruktur zeigt einen Knick des Rückgratverlaufes im Bereich des Tyr⁵-Restes, der aufgrund des D/L-Wechsels in diesem Bereich unvermeidlich ist, wenn beidseits dieses Restes eine Interaktion in β -Faltblattordnung besteht. Wie bereits erläutert, kann ein paralleles β -Faltblatt nur in einem einheitlich konfigurierten Peptidrückgratabschnitt ungehindert existieren, weshalb die detektierte Einbeziehung des L-konfigurierten Ser⁴-Restes in das β -Faltblatt des sonst vollständig D-konfigurierten Sequenzabschnittes von Ac-D-Nal(2)¹ bis D-Pal(3)³ nicht ohne weiteres möglich ist. Die betroffene Region der hypothetischen Dimerstruktur ist aus diesem Grund in Abb. 229 noch einmal im Detail dargestellt. Die klassische Wasserstoffbrücke zwischen den beiden Peptidbindungen ist aus sterischen Gründen nicht zugänglich. Dieser Ausfall wird jedoch durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen der Seitenketten-OH-Gruppe des ersten Peptides mit einer Rückgrat-Carbonyl-Gruppierung des zweiten Peptides kompensiert, sodass die Anordnung der einzelnen Peptidbindungen weiterhin einer parallelen β -Faltblattstruktur entsprechen.

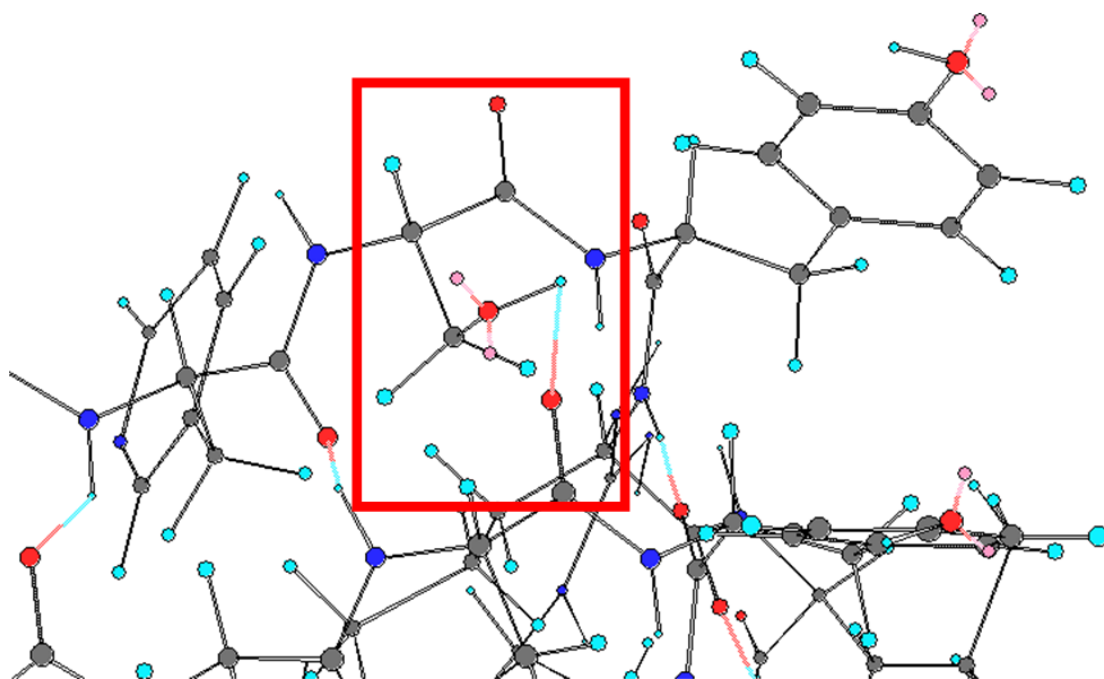


Abb. 229: Kompensation der fehlenden, β -Faltblatt-typischen Wasserstoffbrücke im Bereich des Ser⁴-Restes durch eine Seitenkettenwechselwirkung (blau-rote Linien: H-Brücken)

Für Teverelix lässt sich aufgrund der zu Cetrorelix analogen IR-spektroskopischen Befunde sowie der großen sequentiellen Ähnlichkeit eine vergleichbare Dimerstruktur annehmen. Für Ozarelix treten hingegen deutliche Unterschiede auf. Wie in Abschnitt 4.1.1.2 gezeigt, ist der

Gesamt- β -Faltblattgehalt von Ozarelix gegenüber den beiden anderen GnRH-Antagonisten signifikant reduziert, sodass eine Peptidbindung pro Monomer weniger in dieser Ordnung vorliegt. Noch gravierender ist der Fakt, dass die verbleibenden β -Faltblattanteile zu Teilbanden der Amid I-Bande führen, welche im Vergleich zu den korrespondierenden Teilbanden für Cetrorelix und Teverelix um 6 bzw. 10 cm^{-1} zu höheren Wellenzahlen und somit zu höheren Frequenzen verschoben sind. Die darin zum Ausdruck kommende Erhöhung der relativen Bindungsordnung der C=O-Bindung des betroffenen Peptidrückgrates korreliert mit einer systematischen Schwächung der intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zu dieser Carbonyl-Gruppierung [Milner-White, 1997], wodurch die Stabilisierung der β -Faltblattstruktur ebenfalls reduziert ist.

Bei Betrachtung von Abb. 229 wird ersichtlich, dass die bei Ozarelix vorhandene Rückgratmethylierung an Tyr(Me)⁵ bei der Dimerbildung sterisch mit der besprochenen Seitenketten-Interaktion von Ser⁴ mit dem Rückgrat des anderen Peptides kollidiert. Es ist daher plausibel anzunehmen, dass die gegenüber Cetrorelix fehlende Peptidbindung in β -Faltblattanordnung an dieser Stelle zu lokalisieren ist. Desweiteren könnte die systematische Schwächung der noch vorhandenen Wasserstoffbrücken auf eine im Bereich des Tyr(Me)⁵-Restes sterisch induzierte Verdrehung beider Peptide gegeneinander zurückzuführen sein, da an dieser Stelle die beiden separat vorliegenden β -Faltblattabschnitte aufeinander treffen. Diese Verdrehung könnte einerseits durch die Rückgratmethylierung bewirkt werden, andererseits aber auch mit der in Abschnitt 5.1.1 diskutierten *cis/trans*-Isomerie von Ozarelix in Zusammenhang stehen. Eine Klärung wäre jedoch nur anhand isomerenreiner Verbindungen möglich.

Interessanterweise zeigen die Aggregate der Di-*Tertbutyl*-geschützten Variante von Cetrorelix nahezu die gleichen FTIR-Charakteristika wie Ozarelix-Aggregate (vgl. Abschnitt 4.1.1.2), obwohl in diesem Fall keinerlei unmittelbare Veränderungen am Peptidrückgrat vorliegen, sondern ausschließlich die Seitenketten-OH-Gruppen von Ser⁴ und Tyr⁵ modifiziert sind. Eine Betrachtung der hypothetischen Dimerstruktur in Abb. 229 legt nahe, die Ursache hierfür in der Störung der Serinseitenketten-Interaktion zu suchen, welche aufgrund der sterisch anspruchsvollen Schutzgruppe einerseits nicht mehr stabilisierend wirken kann und andererseits selbst auch eine analoge Verdrehung induzieren könnte, wie sie für Ozarelix vermutet wird.

Eine gewisse Bestätigung erhält diese Vermutung durch eine Neubetrachtung der massenspektrometrischen Resultate von HEMPELT, 2012 an 1:1-Mischungen aus Cetrorelix und dem Di-*Tertbutyl*-geschützten Derivat DG-420099 (vgl. Abb. 230). Anhand dieses

Massenspektrums ist zu erkennen, dass das Homodimer von Cetorelix in etwa mit der gleichen Intensität detektiert wird wie das Heterodimer aus einem Cetorelix- und einem DG-420099-Molekül. Das zu erwartende Homodimer von DG-420099 tritt jedoch nicht signifikant aus dem Rauschen hervor, sodass eindeutig zu konstatieren ist, dass die Stabilisierung der letztgenannten Dimerstruktur deutlich geringer sein muss als diejenige der beiden anderen Dimere. In Hinblick auf Abb. 229 lässt sich diese Beobachtung plausibel damit erklären, dass die Seitenkette mindestens eines Ser⁴-Restes ungeschützt vorliegen muss, um die Rückgratstabilisierung im diesem Bereich herstellen zu können.

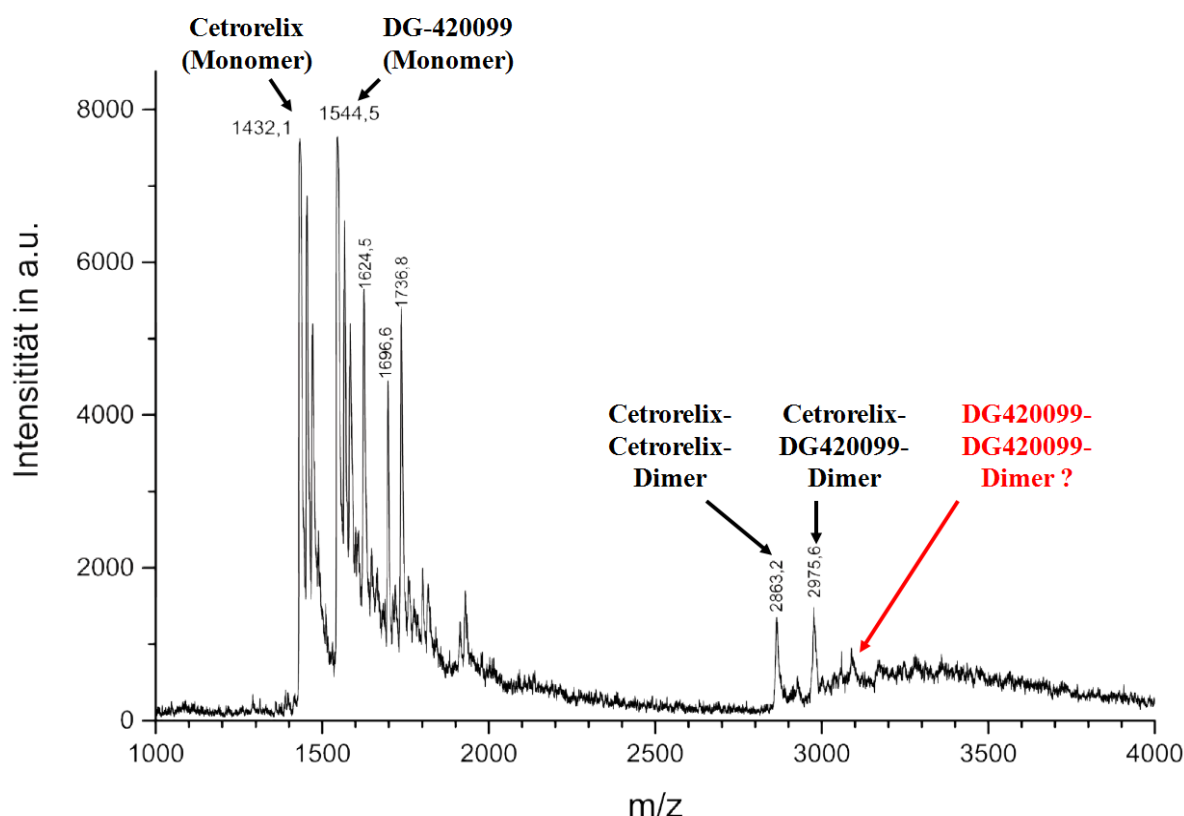


Abb. 230: MALDI-TOF-Massenspektrum einer Mischung aus Cetorelix und seinem Di-*Tertbutyl*-geschützten Derivat DG-420099 (jeweils c = 0,01 mg/ml in 5 mg/ml DHB-Matrix) [modifiziert nach Hempelt, 2012]

Desweiteren ist in Abb. 228 eine hydrophobe Interaktion der Naphthylsysteme der beiden Ac-D-Nal(2)¹-Reste zu erkennen. Da das hohe Aggregationspotential der GnRH-Antagonisten erst durch den Einbau der für die Rezeptorbindung wichtigen, jedoch stark hydrophoben N-terminalen Aminosäuren hervorgerufen wird, wurde bereits frühzeitig ein Zusammenhang zwischen dieser Ansammlung hydrophober Seitenketten und der Ursache für die einsetzende Aggregation vermutet [Bajusz et al., 1988]. SCHNEIDER, 2014 konnte auf der Grundlage von

docking- und *molecular dynamics*-Simulationen auch demonstrieren, dass hydrophobe Interaktionen insbesondere zwischen den Seitenketten von Ac-D-Nal(2)¹, D-Phe(4Cl)² und D-Pal(3)³ eine entscheidende Stabilisierung bei der Di- und Oligomerisierung von GnRH-Antagonisten generieren können. Demgegenüber sind die ersten experimentell nachweisbaren Dimerisierungserscheinungen eindeutig durch polare Wasserstoffbrückenbindungen vermittelt, was in gewisser Weise paradox erscheint [Beil, 2012(1); Hempelt, 2012]. Diesbezüglich muss allerdings berücksichtigt werden, dass sich alle experimentellen Untersuchungen auf eingestellte Gleichgewichtszustände nach 7-tägiger Inkubation beziehen und insoweit nicht in der Lage sind, Prozesse zu erfassen, welche zu potentiellen Assoziationsprodukten führen, die sich innerhalb dieses Zeitraums umstrukturieren.

YANG ET AL., 2007 konnten belegen, dass bereits Konjugate von Dipeptiden mit Naphthylsystemen zu einer Aggregation unter Ausbildung fibrillärer Strukturen neigen, was suggeriert, dass ein analoger Prozess auch für GnRH-Antagonisten in Frage kommt. Unter Einbeziehung der experimentell basierten Dimerstruktur aus Abb. 228 wurde daher in Kooperation mit Dr. A. Schneider eine Ausgangsstruktur für eine *molecular dynamics*-Simulation erstellt, mit welcher der Einfluss des Naphthylsystems auf diese Struktur näher untersucht werden sollte (für Details hierzu siehe: Schneider, 2014). Die anschließend von Dr. A. Schneider durchgeführte MD-Simulation konnte belegen, dass die intermolekulare, hydrophobe Interaktion der beiden Naphthylsysteme eine bestimmte Rückgratkonstellation hervorruft, die eine besonders stabile Wasserstoffbrückenausbildung zwischen den Peptidbindungen in diesem Bereich herbeiführt. In Abb. 231 diese Konstellation im Detail dargestellt. Unter coplanarer Orientierung der beiden Naphthylsysteme können sowohl die Aminogruppe der ersten als auch der zweiten Peptidbindung eine Wasserstoffbrücke mit der Carbonyl-Gruppierung von D-Nal(2)¹ des assoziierten Peptides eingehen. Die simulierte Zufuhr kinetischer Energie im Verlauf der MD-Simulation führt zwar häufig zum Bruch der hydrophoben Wechselwirkung oder einer der möglichen Wasserstoffbrücken in diesem Bereich, gleichsam bewirken die dabei erhaltenen Interaktionen jedoch eine solche Stabilisierung, dass diese Konstellation im Verlauf der Simulation mehrfach wieder zustande kommt.

Die besprochene initiale Wasserstoffbrückenbildung am N-Terminus der Peptide prädestiniert zudem die Bildung der weiteren β -Faltblatt-typischen Wasserstoffbrücken entlang der Peptidsequenz, wie in Abb. 231 zu sehen. Es liegt daher nahe, anzunehmen, dass der initiale Aggregationsschritt von GnRH-Antagonisten in einer hydrophoben Assoziation der N-terminalen Seitenketten unter Ausbildung der erwähnten initialen Wasserstoffbrücken

besteht und anschließend eine rasche Propagation der β -Faltblatt-Ausbildung entlang der Peptidsequenz erfolgt, sodass im experimentell zugänglichen Gleichgewichtszustand die Stabilisierung durch polare Wasserstoffbrückenbindungen dominiert.

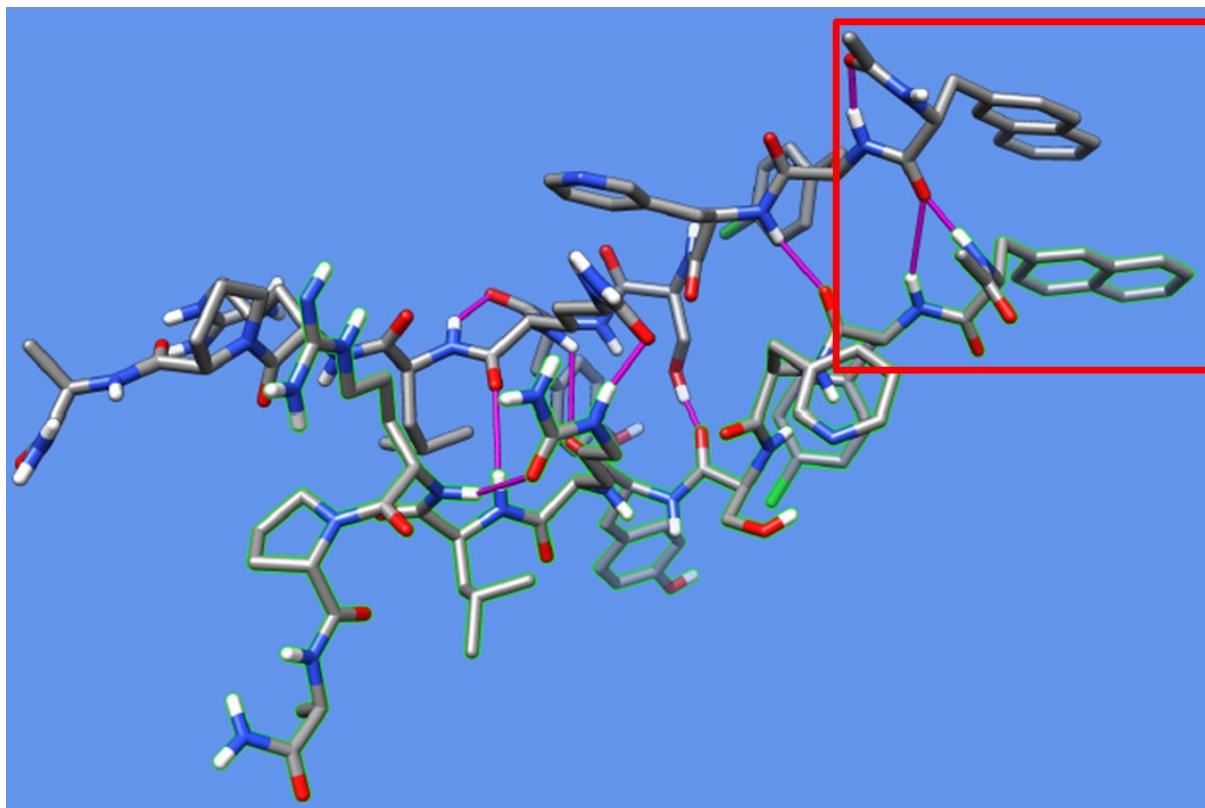


Abb. 231: Veranschaulichung der durch eine Naphthyl-Naphthyl-Interaktion generierten initialen Wasserstoffbrückenbindung in einem Cetorelix-Dimer aus einer MD-Simulation (Wasserstoffbrückenbindungen violett gekennzeichnet) [nach: Schneider, 2014]

Die beschriebene Dimerisierung ist aus der in Abschnitt 5.1.1 für Cetorelix- und Teverelix-Acetat sowie für das *cis*-konfigurierte Ozarelix-Isomer diskutierten Monomerstruktur leicht möglich, da die beiden Sequenzabschnitte, welche für die Formierung der zwei unterschiedlichen β -Faltblatt-Bereiche erforderlich sind, bereits ausgestreckt vorliegen, sodass die kinetische Barriere für diese Assoziation gering ausfällt. Auf der anderen Seite ist für eine Dimerisierung auf Basis der helikalen Konformationen, welche für Teverelix-Trifluoracetat und das *trans*-konfigurierte Ozarelix-Isomer NMR-spektroskopisch ermittelt wurden, zunächst eine Entfaltung nötig, um die intermolekularen β -Faltblatt-Strukturen ausbilden zu können, wodurch dieser Prozess mit einer höheren Energiebarriere verbunden ist.

5.1.3 Fibrillenbildung und Phasenverhalten von GnRH-Antagonisten

An die initiale dimere Assoziation von GnRH-Antagonisten schließt sich ein geordneter Aggregationsprozess an, der sich mithilfe der TCSPC-Methode konzentrationsabhängig verfolgen lässt (vgl. Abschnitt 4.1.2.1). Einerseits lässt sich dabei anhand des allmählichen Anstieges der Fluoreszenz-lebensdauer des Ac-D-Nal(2)¹-Restes dessen schrittweise Einbindung in zunehmend unpolare Umgebungen nachvollziehen. Andererseits können die auftretenden Änderungen des Fluoreszenzverhaltens des Tyr⁵-Restes zur Charakterisierung der Ausbildung der β -Faltblatt-anteile genutzt werden.

Die theoretische Grundlage für diese tyrosinspezifische Interpretation von TCSPC-Daten lieferten NORONHA ET AL., 2004(1) auf der Basis von Untersuchungen an verschiedenen Modellverbindungen. Dabei konnten sie belegen, dass in Abhängigkeit vom rotameren Zustand des phenolischen Ringes der Tyrosinseitenkette unterschiedliche Relaxationsprozesse aus dem angeregten Zustand präferiert werden. In einer bestimmten Konstellation kommt es bevorzugt zu einem Elektronentransfer zwischen phenolischem Ring und der benachbarten Carbonyl-Gruppierung des Peptidrückgrates, wodurch dieses spezielle Rotamer eine drastisch verringerte Fluoreszenzlebensdauer gegenüber den anderen möglichen Rotameren aufweist. Bei freier Drehbarkeit der Tyrosinseitenkette werden demzufolge zwei verschiedene Fluoreszenzlebensdauern in statistischer Verteilung entsprechend der Rotamerpopulation detektiert, wohingegen bei sterischer Hinderung des speziellen Rotameres, wie sie durch die Ausbildung einer entsprechenden Sekundärstruktur des Peptides hervorgerufen wird, der korrespondierende Fluoreszenzemissionsprozess nicht länger detektierbar ist. Die Anwendbarkeit dieses Phänomens zur Verfolgung von ablaufenden Faltungsprozessen wurde anhand verschiedener Beispielproteine demonstriert [Noronha et al., 2004(2)] und bereits in der vorangegangenen Masterarbeit für die Untersuchung der Aggregationsstufen von Cetrorelix und Ozarelix genutzt [Beil, 2012(1)].

In der vorliegenden Arbeit werden diese Prinzipien auf den Fall des GnRH-Antagonisten Teverelix übertragen. Wie in Abschnitt 4.1.2.1 beschrieben, ist bereits bei Peptidkonzentrationen deutlich unterhalb von 0,01 mg/ml in dem standardisierten Solvens 10 mM Ammoniumacetat-Lösung (pH 7,0) die Ausbildung von β -Faltblattstrukturen zu beobachten. Oberhalb einer Konzentration von 0,05 mg/ml ist der für eine freie Drehbarkeit des Tyrosyl-Restes charakteristische Fluoreszenzprozess nicht mehr zu erkennen, sodass an dieser Stelle die Ausbildung der genannten Faltblattstruktur als abgeschlossen angesehen werden kann. Gleichzeitig fällt diese Konzentration genau mit der für Teverelix

beschriebenen kritischen Aggregatbildungskonzentration *cac* zusammen, für welche auf der Basis der Emissionsspektrenänderung statischer Fluoreszenzspektroskopie eine konzertierte Seitenketteninteraktion in Form der Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der phenolischen OH-Gruppe von Tyr⁵ mit einer entsprechenden Akzeptorgruppierung abgeleitet wurde [Schneider et al., 2010; Schneider, 2014].

Dieses Verhalten wird in analoger Form auch für Cetrorelix gefunden, wohingegen die Rückgratmethylierung der Tyr(Me)⁵-Seitenkette von Ozarelix eine ähnlich präzise Analyse nicht zulässt, da der notwendige Elektronentransfer im angeregten Zustand per se unterbunden wird [Beil, 2012(1)]. Die Koinzidenz des mittels TCSPC ermittelten Endpunktes der β -Faltblattausbildung und der anhand der *cac* mithilfe verschiedenster Methoden ermittelten Seitenketteninteraktion des Tyr⁵-Restes für Cetrorelix und Teverelix verweist darauf, dass die Existenz des β -Faltblattes eine Vorbedingung für die Seitenketteninteraktion darstellt.

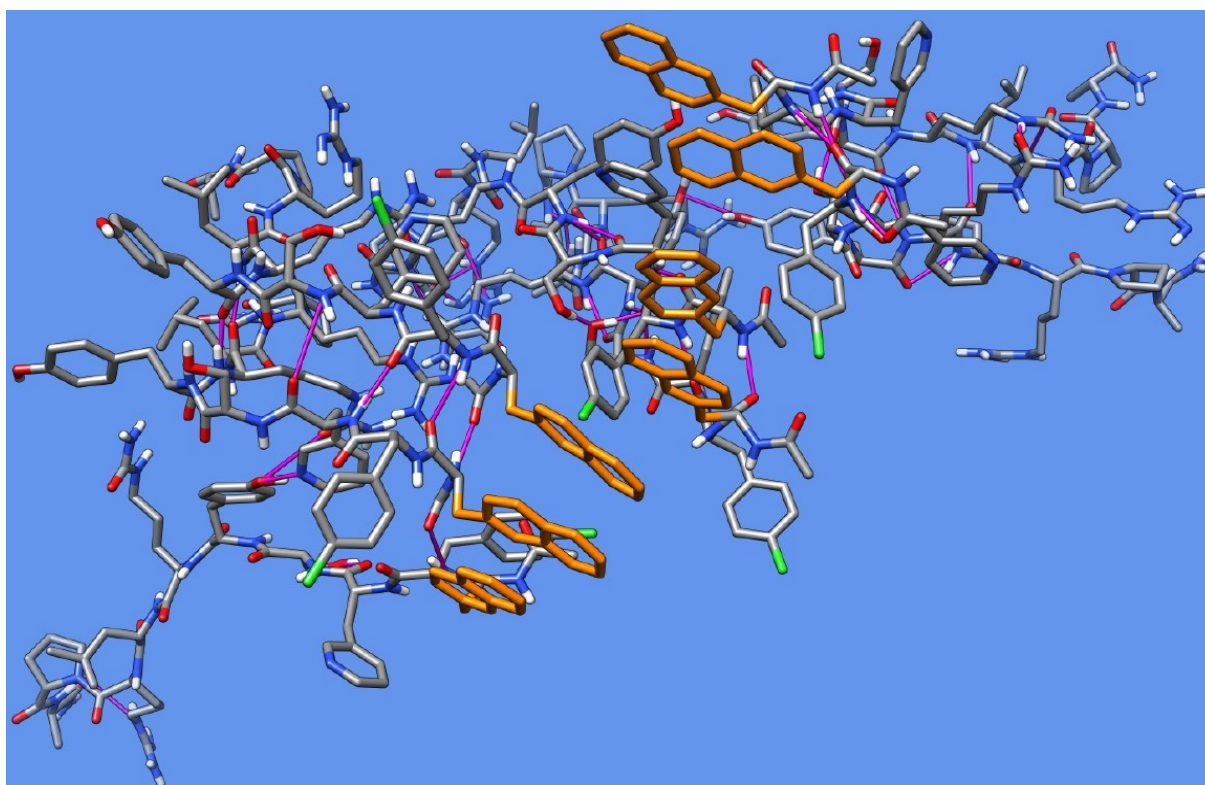


Abb. 232: Modell einer fibrillären Teilstruktur von Cetrorelix-Aggregaten unter hydrophober Assoziation mehrerer Dimere und eines Monomers im N-terminalen Bereich (Naphthylsysteme von Ac-D-Nal(2)¹ orange hervorgehoben) [Schneider, 2014]

Eine Betrachtung des konzentrationsabhängigen Anstieges der Fluoreszenzlebensdauer des Naphthylsystems von Ac-D-Nal(2)¹ zeigt auch im Fall von Teverelix, dass die hydrophobe Zusammenlagerung unter Beteiligung des N-Terminus auch nach Überschreiten der *cac*

weiter voranschreitet. SCHNEIDER, 2014 konnte auf Basis seiner *molecular modelling*-Ergebnisse darlegen, dass mit steigender Aggregationszahl die hydrophobe Stabilisierung speziell des Naphthylsystems zunimmt und leitete daraus ab, dass es im Verlauf der Aggregation zu einer schrittweise verstärkten Ausrichtung der N-Termini von GnRH-Antagonisten zueinander kommt. Da aufgrund der elektrostatischen Repulsion der Arg⁸-Reste zudem im C-terminalen Bereich ein Versatz der Peptidketten zueinander zu erwarten ist, postulierte er die Bildung einer helikalen Fibrille mit einem hydrophoben Kern und einer positiv geladenen Oberfläche, wie sie in Abb. 232 anhand einer heptameren Untereinheit eines Cetorelix-Aggregates veranschaulicht ist.

Diese Fibrillen verhalten sich in wässrigen Lösungen als rigide, stäbchenförmige Objekte, was die Voraussetzung für flüssig-kristallines Verhalten bildet [Vorländer, 1923]. Diesbezüglich konnte bereits in früheren Arbeiten die Ausbildung einer nematischen Mesophase in 0,1 M Essigsäure für Cetorelix oberhalb einer Peptidkonzentration von 4 mg/ml und für Ozarelix oberhalb von 8 mg/ml nachgewiesen werden [Beil, 2012(1)]. In der vorliegenden Arbeit kann für Teverelix ebenfalls oberhalb von 4 mg/ml die Ausbildung doppelbrechender Strukturen belegt werden, jedoch erscheint in Systemen mit diesem GnRH-Antagonisten die generierte Fernordnung unter den genannten Bedingungen weit weniger weitreichend als in Systemen mit Cetorelix oder Ozarelix (vgl. Abschnitt 4.1.2.2). In diesem Kontext ist bemerkenswert, dass bereits EICHLER, 2007 mithilfe der kalorimetrischen Titration für Teverelix im Gegensatz zu den anderen GnRH-Antagonisten keine eindeutigen Hinweise auf eine geordnete Mesophasenausbildung finden konnte. Der einzige gravierende strukturelle Unterschied zwischen Teverelix und den beiden anderen Peptiden besteht im Austausch des Arg⁸-Restes durch einen Lys(iPr)⁸-Rest, was suggeriert, dass die damit verbundene Änderung bezüglich der elektrostatischen Repulsion zu den beobachtbaren Diskrepanzen bei der Mesophasenbildung führt.

Sowohl die Mesophasenbildung als auch die Fibrillenbildung lassen sich in Gegenwart von organischen Lösemitteln, wie Ethanol oder DMSO, verringern (vgl. Abschnitte 4.1.2.3 & 4.1.2.4). Die in diesem Kontext ermittelten Phasendiagramme für Cetorelix und Ozarelix in Ethanol/Wassermischungen demonstrieren, dass mit abnehmendem Ethanolanteil in der Mischung die notwendigen Phasenübergangstemperaturen steigen, sodass im Umkehrschluss deutlich wird, dass im Rahmen der Aggregation auftretende attraktive Wechselwirkungen durch Ethanolzugabe systematisch geschwächt werden. Angesichts der Tatsache, dass die denaturierende Wirkung von Alkoholen im Wesentlichen auf die Schwächung hydrophober

Interaktionen zurückgeführt wird [Thomas & Dill, 1993], wird damit die Bedeutung solcher Wechselwirkungen bei der Fibrillenbildung untermauert.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit unternommenen Anstrengungen zur Gewinnung geordneter Festkörper aus der Mesophase von GnRH-Antagonisten-Aggregaten stellten sich als äußerst problematisch heraus. Während der in Abschnitt 4.1.3.1 dargelegte Ansatz zur Induktion einer Festphasenbildung durch pH-Veränderung offensichtlich an dem parallel erfolgenden Verlust der Fernordnung scheitert, können auf dem Weg eines temperatur-induzierten Phasenüberganges in ethanolhaltigen Systemen durchaus doppelbrechende Festkörper gewonnen werden, die selbst Kongorot in amyloid-spezifischer Form binden (vgl. Abschnitt 4.1.3.2). Diese liegen jedoch in einer hochviskosen Mutterlauge vor und sind äußerst empfindlich, sodass eine Isolierung der einzelnen Festkörper ohne Verlust der Doppelbrechung nicht gelungen ist und daher eine Strukturaufklärung an diesen Festkörpern nicht realisiert werden konnte.

5.1.4 Aggregationscharakteristika des GHRH-Analogons und verallgemeinerungsfähige Aspekte

Anhand des untersuchten GHRH-Analogons wird ein von GnRH-Antagonisten erheblich abweichendes Peptid als Vergleichsmodell für die Aggregation synthetischer Peptide betrachtet. Das GHRH-Analogon ist etwa dreimal so lang wie ein GnRH-Antagonist und weist keine identischen Sequenzabschnitte auf. Allerdings verfügt es ebenfalls über eine in natürlichen Peptiden nicht vorkommende, extrem hydrophobe N-terminale Modifikation, wie sie auch bei den betrachteten GnRH-Antagonisten vorliegt.

Sowohl die IR-spektroskopischen Untersuchungen an den Aggregaten des GHRH-Analogons als auch die Sondenbindungsstudien mit den struktur-sensitiven Sonden ThioT und Kongorot lassen keinen Zweifel daran, dass auch dieses Peptid amyloidartige Strukturen bei der Aggregation ausbildet (vgl. Abschnitte 4.2.1 & 4.2.2.2). Der detektierte β -Faltblattgehalt übersteigt jedoch in keinem Fall 20 %, wohingegen die für Cetrorelix und Teverelix ermittelten Werte bis zu 70 % und für Ozarelix immer noch 60 % betragen, sodass von einer deutlich schwächeren Stabilisierung im Falle der Aggregate des GHRH-Analogons auszugehen ist. Prinzipiell sind größere Peptide auch eher in der Lage dezidierte Monomerkonformationen zu stabilisieren, die zusätzliche kinetische Barrieren für die Amyloidbildung generieren (vgl. Abschnitt 1.2), als kürzere Peptide. Diese Annahme wird im

Falle des GHRH-Analogons auch dadurch bestätigt, dass IR-Befunde auf eine ausgeprägte helikale Konformation im stark sauren Milieu hinweisen (vgl. Abschnitt 4.2.1.1).

Beim Fortschreiten der Aggregation bilden sich gleichfalls fibrilläre Strukturen aus, deren Durchmesser mittels TEM mit ca. 13-16 nm bestimmt werden kann (vgl. Abschnitt 4.2.4.1). Der Durchmesser der Fibrillen ist damit geringfügig größer als der von GnRH-Antagonisten, welcher in vergleichbaren TEM-Aufnahmen mit ca. 6 - 12 nm beschrieben wurde [Kick, 2007; Maji et al., 2008].

Die Ausbildung der aggregat-typischen β -Faltblattstruktur ist für das GHRH-Analogon ebenso wie für GnRH-Antagonisten pH-abhängig und erfolgt bei Überschreiten eines bestimmten pH-Wertes sprunghaft. Der konkrete pH-Wert, bei welchem dieser Aggregationsschritt nachweisbar wird, unterscheidet sich zwischen GnRH-Antagonisten und dem GHRH-Analogon jedoch gravierend. Während Cetorelix, Teverelix und Ozarelix unisono zwischen pH 3,0 und pH 4,0 zur β -Faltblattbildung übergehen, wird dieser Effekt für das GHRH-Analogon erst zwischen pH 5,0 und pH 7,0 beobachtet (vgl. Abschnitte 4.1.1.3 & 4.2.1.2). Eine solche sprunghafte Eigenschaftsänderung bei einem diskreten pH-Wert lässt sich plausibler Weise nur mit der Änderung eines Protonierungszustandes erklären. Daher ist es äußerst wahrscheinlich, den Beginn der Aggregation mit der Deprotonierung des D-Pal(3)³-Restes ($pK_S = 3,85$ [SwissSideChain, 2015]) bei GnRH-Antagonisten bzw. mit der Deprotonierung von Histidyl-Resten des GHRH-Analogons ($pK_S = 6,10$ [SwissSideChain, 2015]) in Verbindung zu bringen. Der aggregationsförderliche Effekt der Deprotonierung dieser heterozyklischen Seitenketten könnte trivialer Weise sowohl auf der Reduktion intermolekularer, elektrostatischer Repulsion beruhen, als auch auf einer dadurch induzierten Konformationsänderung, wie sie für Teverelix NMR-spektroskopisch nachzuweisen ist (vgl. Abschnitt 5.1.1).

In jedem Fall spricht viel dafür, dass die Aggregation vorrangig, wenn nicht gar exklusiv aus dem an der jeweiligen heterozyklischen Seitenkette deprotonierten Monomer heraus erfolgt. In diesem Kontext ist aufgrund der deutlich unterschiedlichen pK_S -Werte für das GHRH-Analogon unter physiologischen Bedingungen von einer markant höheren Population des protonierten Zustandes auszugehen als für GnRH-Antagonisten. Auch wenn in beiden Fällen somit die deprotonierte Form absolut begünstigt ist, so könnte diese Diskrepanz nichtsdestotrotz zu dem geringeren Aggregationspotential des GHRH-Analogons beitragen.

Die durchgeführten Untersuchungen mit den Sonden ThioT und Kongorot belegen zudem einen stark aggregationsfördernden Einfluss physiologischer Mengen an Natriumchlorid. Ein

ähnlicher Einfluss wurde bereits durch LANG, 1998 für Cetrorelix beschrieben und ist allgemeingültig für GnRH-Antagonisten zu beobachten.

Die NMR-spektroskopische Aufklärung der Monomerstruktur auf Basis zweidimensionaler Techniken kann, wie in Abschnitt 4.2.5 dargelegt, aufgrund starker Signalüberlappungen nur einzelne Strukturcharakteristika des GHRH-Analogons darstellen. Für eine detailliertere Strukturbestimmung wäre der Übergang zu drei- oder mehrdimensionalen Techniken daher von erheblichem Vorteil. Es geht jedoch bereits aus den vorliegenden Resultaten hervor, dass der hydrophobe N-Terminus eine bedeutende Rolle für die intramolekulare Stabilisierung spielt und dabei Kontakte zu einem weit entfernten Sequenzabschnitt aufbaut, die zur Formierung einer Schleifenstruktur führen. Wie in Abschnitt 4.2.5.2 ausgeführt, gibt es in der Peptidsequenz zwei stark übereinstimmende Abschnitte, die jeweils einen Histidyl-, einen Ornithyl- und zwei hydrophobe Aminosäure-Reste enthalten und als Interaktionspartner für den modifizierten N-Terminus in Frage kommen. In Abhängigkeit von der konkreten Peptidsynthese scheinen auch beide Faltungsvarianten vorzukommen, auch wenn in diesem Fall eine Absicherung durch eine 3D-Technik dringend erforderlich wäre. Eine solche unterschiedliche Monomerfaltung könnte potentiell mit einer Diskrepanz der kinetischen Barrieren für die einsetzende Aggregation einhergehen und insoweit auch eine Änderung des Aggregationsverhaltens des Peptides nach sich ziehen.

Der modifizierte N-Terminus bietet zwar in Analogie zu den Strukturen der GnRH-Antagonisten einen hervorragenden Ansatzpunkt für hydrophobe Assoziationen, die möglicherweise als Ausgangspunkt für weitere Aggregationsschritte dienen können, eine ähnlich stabile Konstellation wie in Abschnitt 5.1.2 für die initiale Wasserstoffbrücke von GnRH-Antagonisten dargestellt, ist in diesem Fall jedoch nicht zu erwarten. Die im Falle des GHRH-Analogons vorliegende Struktur aus einem Phenylsystem in Kombination mit einer langen aliphatischen CH₂-Kette kann keine ähnlich fixierte Struktur generieren, wie es die coplanare Anordnung der N-terminalen Naphthylsysteme der GnRH-Antagonisten vermögen. Möglicherweise liegt hierin auch die Begründung für die unerwartete Beobachtung von ZARÁNDI ET AL., 1994, dass eine Verstärkung der Hydrophobie der N-terminalen Aminosäuren von GHRH-Antagonisten zwar grundsätzlich aufgrund einer gesteigerten Rezeptoraffinität deren Wirkung erhöht, der Einbau eines Naphthylsystems an dieser Position die Aktivität jedoch drastisch senkt.

5.2 Inhibitoren der Aggregation von GnRH-Antagonisten und des GHRH-Analogs

5.2.1 Inhibitoren der Aggregation von GnRH-Antagonisten

GnRH-Antagonisten neigen in wässrigen Lösungen schon bei sehr geringen Konzentrationen zur Ausbildung amyloider Aggregate, wie in Abschnitt 5.1 ausführlich erläutert. Peptidaggregate dieses Strukturtypes tendieren in vielen Fällen unter physiologischen Bedingungen zur Bildung unlöslicher Ablagerungen [Sipe, 2005], was die systemische Verteilung des Wirkstoffes nach Applikation und seine Bioverfügbarkeit in erheblichem Umfang beeinträchtigen würde. Daher besteht großes Interesse an der Identifikation von Aggregationsinhibitoren, welche in der zu applizierenden Formulierung mit dem GnRH-Antagonisten so interagieren, dass die Amyloidbildung verhindert und eine schrittweise Freisetzung des Wirkstoffes in seiner aktiven Form ermöglicht wird.

Bereits in früheren Arbeiten konnte unter Nutzung der ATR-FTIR-Spektroskopie und der TCSPC demonstriert werden, dass Poly-L-Glutamat mit Cetorelix Komplexe bildet, in denen die amyloid-typische β -Faltblattstruktur teilweise aufgehoben wird [Beil, 2012(1)], was die prinzipielle Möglichkeit nahe legt, dass sich dieser Effekt ggf. für eine solche Aggregationsinhibition nutzen lässt. Für diesen Zweck ist es jedoch erforderlich, untersuchen zu können, auf welche Teile der Aggregatstruktur Poly-L-Glutamat Einfluss nimmt und ob sich dieser Effekt für eine hinreichende Destabilisierung der gesamten Aggregatstruktur eignet.

Wie in Abschnitt 4.4.3.1 beschrieben, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit diesbezüglich ein spezielles Verfahren zur Quantifizierung des Amyloidgehaltes von GnRH-Antagonisten auf Basis einer struktur-sensitiven Fällungstitration mit Kongorot entwickelt werden, welches sich auch für quantitative Untersuchungen zur Destabilisierung dieser Aggregatstruktur in Gegenwart potentieller Inhibitoren anwenden lässt.

Mithilfe dieses Verfahrens kann eine Störung der Amyloidstruktur von Cetorelix-Aggregaten durch Poly-L-Glutamat eindeutig bestätigt werden. Dabei nimmt der detektierte Amyloidgehalt für Poly-L-Glutamat/Cetorelix-Massenverhältnisse unterhalb von 0,4 : 1 mit steigendem Poly-L-Glutamat-Gehalt systematisch ab, nähert sich dann jedoch bei weiterer Steigerung der zugesetzten Menge asymptotisch einem Restgehalt von ca. 50 % (vgl. Abb. 168). Somit erscheint die Wirkung von Poly-L-Glutamat auf einen bestimmten Bereich der Aggregatstruktur begrenzt, während andere Bereiche offenkundig nicht beeinflusst werden. Wie in Abschnitt 5.1 dargelegt, kann anhand der ATR-FTIR-spektroskopischen Studien gezeigt werden, dass zwei separate β -Faltblattbereiche in Aggregaten von GnRH-

Antagonisten existieren, welche innerhalb der Sequenz durch eine Krümmung im Bereich der Aminosäure in Position 5 voneinander getrennt vorliegen. Die N-terminal von dieser Position bestehende β -Faltblattstruktur beinhaltet unter den Bedingungen der Kongorottitration (pH 7,0) ausschließlich ungeladene und vorrangig stark hydrophobe Seitenketten, wohingegen der C-terminal gelegene β -Faltblattbereich teilweise hydrophile Seitenketten, wie D-Cit⁶, und insbesondere die positiv geladene Seitenkette von Arg⁸ aufweist. In Anbetracht der polyanionischen Natur von Poly-L-Glutamat ist daher eine elektrostatisch stabilisierte Wechselwirkung mit dem C-terminal von Position 5 gelegenen β -Faltblattbereich stark begünstigt und könnte dementsprechend begründen, dass eine Strukturbeeinflussung ausschließlich in diesem Bereich wirksam werden kann, während der N-terminal von Position 5 lokalisierte β -Faltblattanteil unangetastet bleibt.

Mit dem Ziel, Inhibitoren zu finden, welche nicht nur auf einen Teil, sondern auf die gesamte Aggregatstruktur von GnRH-Antagonisten destabilisierend wirken, rückten Tannine in den Fokus, da für einige Vertreter dieser pflanzlichen Polyphenole bereits eine hemmende Wirkung auf die Amyloidbildung anderer Peptide berichtet wurde (vgl. Abschnitt 1.4.3).

Die in Abschnitt 4.4.3.2 dargestellten Resultate zur Beeinflussung des Amyloidgehaltes von Cetrorelix durch eine ungetrennte Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* demonstrieren einerseits eine hohe Effizienz dieses Gemisches in Bezug auf die beabsichtigte Hemmung der Peptidaggregation, verweisen andererseits aber auch auf eine ausgeprägte Abhängigkeit dieses Effektes von den konkreten Präparationsbedingungen solcher Formulierungen. Während bei Zugabe der Gallotanninmischung zu einer neutralisierten Lösung des GnRH-Antagonisten nur eine maximale Reduktion des Amyloidgehaltes um ca. 50 % zu erzielen ist, kann bei Vermischung beider Komponenten bei pH 3,0 und erst nachträglich erfolgender Neutralisation eine Reduktion um mehr als 80 % erreicht werden. Wie bereits in Abschnitt 5.1 diskutiert, tritt die Dimerisierung von GnRH-Antagonisten als initialer Schritt der Aggregation infolge der Änderung des Protonierungszustandes von D-Pal(3)³ erst oberhalb von pH 4,0 markant auf, sodass für pH 3,0 vorrangig Monomere des Peptides vorliegen, wohingegen bei pH 7,0 bereits voll ausgebildete Aggregate dominieren.

Die Gallotanninmischung ist somit offensichtlich in der Lage, bei bereits formierten Aggregaten ca. 50 % der Struktur wieder aufzulösen, während der darüber hinaus verbleibende Anteil unter diesen Voraussetzungen nicht attackiert wird. Wird die Gallotanninmischung hingegen bei pH 3,0 mit dem monomeren Peptid in Kontakt gebracht, kann eine Interaktion erfolgen, die bei einer anschließenden Neutralisierung die Neubildung von amyloiden Strukturen annähernd vollständig verhindert. In Anbetracht bekannter

Wirkungsmechanismen anderer Inhibitoren (vgl. Abschnitt 1.2.2) ist anzunehmen, dass hierbei eine direkte Assoziation von Tannin zu Peptidmonomer zustande kommt, durch welche einerseits eine Konformation des Peptides induziert wird, die durch eine erhöhte kinetische Barriere vom entsprechenden Aggregationspfad getrennt ist, und durch welche andererseits eine sterische Abschirmung entsteht, die eine direkte Peptidassoziation erschwert. Um ein tiefer gehendes Verständnis dieses hoch interessanten Phänomens zu ermöglichen, ist allerdings zunächst eine Trennung und Charakterisierung der entahltenen Tanninspezies erforderlich, um darauf aufbauend Struktur-Eigenschaftsbeziehungen der entstehenden Komplexe mit GnRH-Antagonisten untersuchen zu können.

5.2.2 Aufklärung struktureller Charakteristika der untersuchten Tannine

Die als Ausgangsmaterial kommerziell bezogene Tanninmischung wird im industriellen Maßstab aus Pflanzengallen von *Rhus chinensis* gewonnen. Frühe Untersuchungen von NISHIZAWA ET AL., 1982 konnten belegen, dass diese Pflanze vorwiegend Gallotannine produziert, was durch die strukturanalytischen Studien der vorliegenden Arbeit auch für die hier verwendete Tanninmischung außer Zweifel steht.

Die methanolytische Spaltung der Depsidbindungen führt bei vollständigem Ablauf der Reaktion nach 24 h dazu, dass neben den Spaltungsprodukten Gallussäure, Methylgallat und geringen Mengen an Mono- und Digalloylglukosen vorwiegend je ein spezielles Isomer einer Tri-, Tetra- und Pentagalloylglukose gefunden werden (vgl. Abschnitt 4.3.2). Die in Abschnitt 4.3.2.5 dargelegten Ergebnisse der NMR-spektroskopischen Strukturaufklärung an den entsprechend in Reinform isolierten Verbindungen erlauben eine eindeutige Identifikation dieser Substanzen als 1,2,6-O-Trigalloyl- β -D-Glukose (3GG), 1,2,3,6-O-Tetragalloyl- β -D-Glukose (4GG) und 1,2,3,4,6-O-Pentagalloyl- β -D-Glukose (PGG). Genau diese Isomere werden bei der gerichteten Biosynthese von Gallotanninen in Eichen- und Sumachgewächsen auch regiospezifisch gebildet [Grundhöfer et al., 2001], sodass deren Vorkommen nicht weiter überrascht.

Die intensive Bildung aller drei Spezies im Zuge der Methanolyse weist darauf hin, dass alle diese Galloylglukosen als Ausgangspunkt für die Generierung von Depsidbindungen in *Rhus chinensis* dienen können, wohingegen NIEMETZ & GROSS, 1999 zu dem Ergebnis kamen, dass die isolierbaren Galloyl-Transferasen, welche Depsidbindungen aufbauen können, lediglich die entsprechende Pentagalloylglukose als Substrat akzeptieren. Die Möglichkeit, dass

diejenigen Tanninspezies, welche offensichtlich Depsidbindungen an 3GG- bzw. 4GG-Grundkörpern tragen, durch Hydrolyseerscheinungen nachträglich entstehen, ist in diesem Kontext höchst unwahrscheinlich, da einerseits die Spaltung der deutlich labileren Depsidbindungen gegenüber den Esterbindungen zum Glukose-Kern bevorzugt ablaufen sollte und zudem eine ungesteuerte Hydrolyse die vorzufindende Regiospezifität der freien OH-Gruppen nicht plausibel begründen kann.

Mono- und Digalloylglukosen lassen sich nur in geringen Mengen aus der Gallotanninmischung isolieren und entstehen gleichfalls im Zuge der methanolytischen Spaltung nur in geringfügigem Ausmaß (vgl. Abschnitte 4.3.1.2 & 4.3.2.1), sodass davon auszugehen ist, dass die weiterführende Galloylierung dieser Verbindungen gegenüber ihrer Bildung *in vivo* stark begünstigt ist, wodurch sich im Rahmen der Homöostase keine größeren Konzentrationen dieser Spezies in der Pflanze anreichern. Dabei ist zu beachten, dass Mono- und Digalloylglukosen für enzymatische Galloylierungen im Gegensatz zu höher galloylierten Verbindungen als acylierende Cosubstrate fungieren und daher der Regulierung der Konzentrationen eben jener Spezies *in vivo* eine besondere Bedeutung zukommt (vgl. Abschnitt 1.4.3).

Die Isomerenvielfalt von Monogalloylglukosen ist im Verhältnis zu den höher galloylierten Vertretern insbesondere dadurch eingeschränkt, dass in diesem Fall nur die fünf OH-Gruppen der Glukose als Veresterungspunkte in Frage kommen und die Erweiterung der Möglichkeiten durch Depsidbindungen erst für Digalloylglukosen zu berücksichtigen ist. In Abb. 114 ist deutlich zu erkennen, dass alle 5 resultierenden Konstitutionsisomere für Monogalloylglukosen in der Gallotanninmischung in vergleichbaren Mengen nachweisbar sind, wohingegen in derselben Abbildung bereits für Digalloylglukosen eine Begrenzung auf 2 bis 3 Hauptvertreter zu erkennen ist. Angesichts der grundlegend niedrigen Gehalte an Monogalloylglukosen ist es denkbar, dass die zu den höheren Galloylglukosen in Widerspruch stehende Isomerenvielfalt auf Hydrolyse- und enzymatische Degradationserscheinungen zurückzuführen ist. Gleichfalls lässt sich auf Basis dieser Resultate keinesfalls ausschließen, dass *Rhus chinensis* selbst nicht doch in der Lage ist, Glukose an anderen Positionen als der bekannten C1-Position [Gross, 1983(1)] zu galloylieren und die beobachtete regioselektive Galloylierung der Digalloylglukosen in der Folge durch die Substratspezifität der entsprechenden Galloyltransferase zustande kommt.

Im Rahmen der methanolytischen Behandlung der Gallotanninmischung tritt intermediär eine Spezies auf, welche nicht in das einheitliche Strukturschema der Galloylglukosen passt. Wie

in Abschnitt 4.3.2.2 dargestellt, eluiert diese Verbindung auf einer RP-18-HPLC-Säule später als PGG und das dazugehörige Molekölion wird bei $m/z = 680$ detektiert.

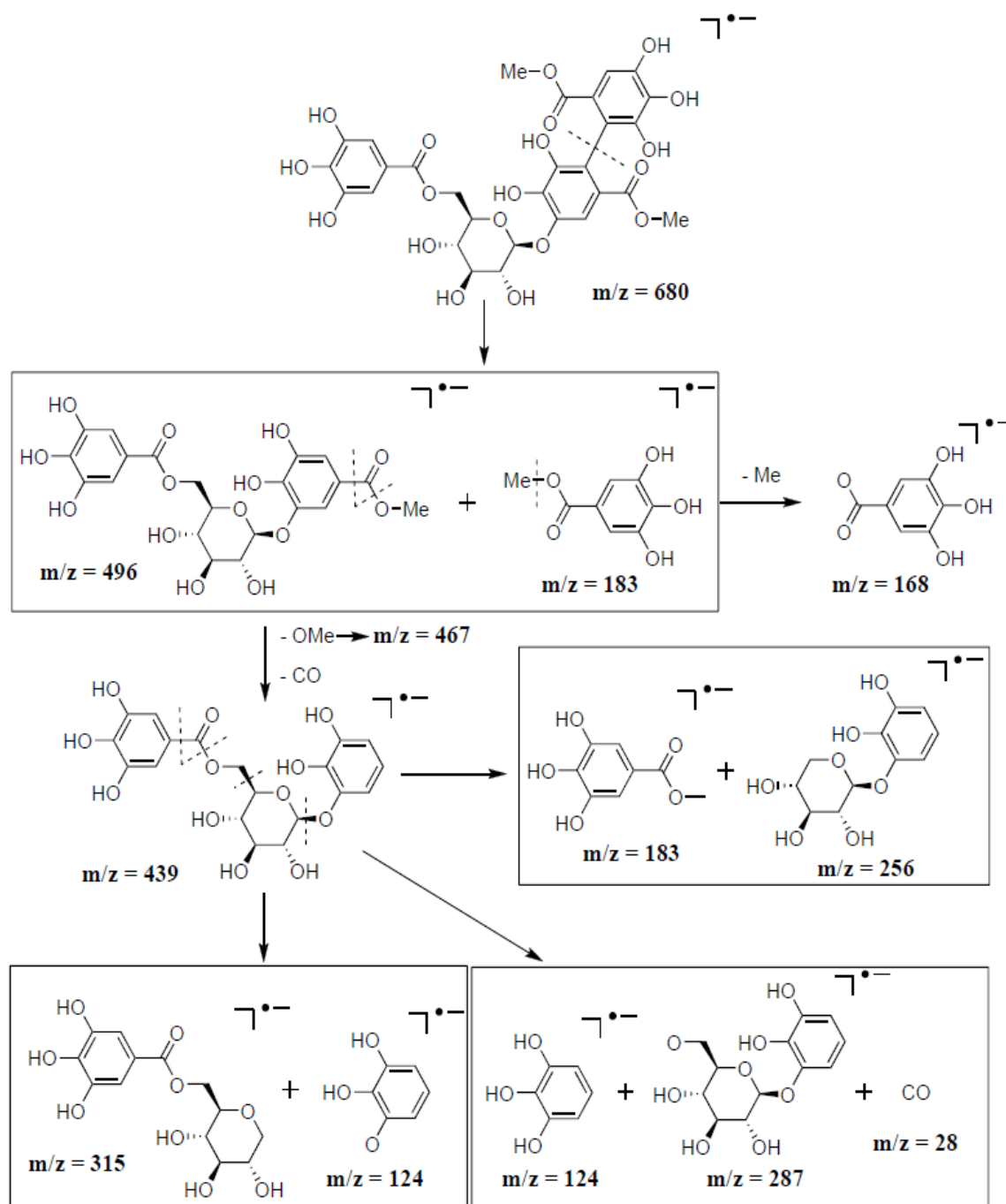


Abb. 233: Strukturvorschlag und Fragmentierungspfade für die während der Methanolyse der Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* intermediär auftretende Tanninspezies

Der Austausch des Methanols während der selektiven Depsidbindungsspaltung durch Ethanol bzw. *n*-Propanol generiert anstelle dieser Verbindung neue Substanzen mit charakteristisch vergrößerter Molekülmasse, aus welcher eindeutig zu schlussfolgern ist, dass die entsprechende Verbindung im Zuge der Alkoholyse an zwei Säuregruppen mit dem

jeweiligen Alkohol verestert wird. Da in allen Fällen die freie Säuregruppe der Gallussäure unter den gewählten Konditionen selbst keine Veresterung zeigt, ist unter Berücksichtigung des Grundprinzips der Methanolyse davon auszugehen, dass diese beiden Säuregruppen vor der Behandlung in depsidartige Bindungen integriert vorliegen.

Das in Abb. 126 dargestellte, mithilfe eines Tochterionen-Scans der entsprechenden Verbindung erhaltene Massenspektrum enthält mehrere Fragmentmassen, mit deren Hilfe eine Strukturhypothese aufgestellt werden kann. Abb. 233 veranschaulicht die hypothetische Struktur und gibt die wahrscheinlichen Fragmentierungspfade für die detektierten m/z -Werte an.

Die in Abb. 233 dargestellte Struktur beinhaltet eine Substruktur, in welcher die phenolischen Ringe zweier Gallussäureeinheiten durch eine C-C-Bindung miteinander verbunden sind. Solche Strukturen sind charakteristisch für sogenannte Ellagitannine (vgl. Abschnitt 1.4.3). Allerdings ist eine solche Bindung typischerweise hydrolyse- und methanolysenstabil, weshalb zu erwarten wäre, eine solche Ellagsäureeinheit im Methanolysat nachweisen zu können, was in der vorliegenden Arbeit in keiner Untersuchung möglich war. Nichtsdestotrotz lässt die Analyse der massenspektrometrischen Daten keinen Zweifel am Vorliegen einer solchen Substruktur.

Die im Verlauf der Alkoholysen veresterten Säuregruppen könnten bei Betrachtung dieser Struktur zuvor zwar in Depsidbindungen zu weiteren Gallussäureeinheiten eingebunden sein, wahrscheinlicher ist jedoch eine Laktonbildung mit einer OH-Gruppe des zweiten phenolischen Ringes innerhalb der Ellagsäureeinheit.

Einige m/z -Verhältnisse, wie z.B. 256 und 287, können plausibel nur dann erklärt werden, wenn die Bindung zwischen einer Gallus- oder Ellagsäureeinheit und der Glukose in Form einer Art pseudo-glykosidischer Bindung mit einer phenolischen OH-Gruppe anstelle der normalerweise auftretenden Esterbindung mit der Säuregruppe zustande kommt. Eine solche Tanninspezies ist bisher nicht beschrieben worden, weshalb B.Sc. P. Körner im Rahmen eines Praktikums versuchte, das Fragmentierungsverhalten der Verbindung mit einer Spezies in Einklang zu bringen, die dem klassischen Strukturkonzept eines Ellagitannins entspricht.

Die auf Basis dieser Überlegung von ihm vorgeschlagene Strukturhypothese ist samt theoretischen Fragmentierungspfaden in Abb. 234 wiedergegeben. Die Strukturhypothese geht ebenfalls von einer Ellagsäure-Substruktur mit C-C-Bindung aus, sodass auch diesem Fall das nicht nachweisbare Auftreten von Ellagsäure im Methanolysat unerklärlich ist. In diesem Fall können eine Reihe von Fragmentmassen plausibel erklärt werden - allerdings deutlich weniger als im Falle der Strukturhypothese aus Abb. 233.

Eine abgesicherte Strukturaufklärung ist daher allein aus den LC-MS/MS-Daten nicht möglich. Mit Sicherheit zeigt das Experiment jedoch, dass es innerhalb der verwendeten Gallotanninmischung Verbindungen gibt, die von der klassischen Gallotanninstruktur abweichen, dabei aber ähnliche Teilstrukturen und damit potentiell auch ähnliche Wechselwirkungsmöglichkeiten bieten, was für den pharmazeutischen Einsatz relevant sein könnte.

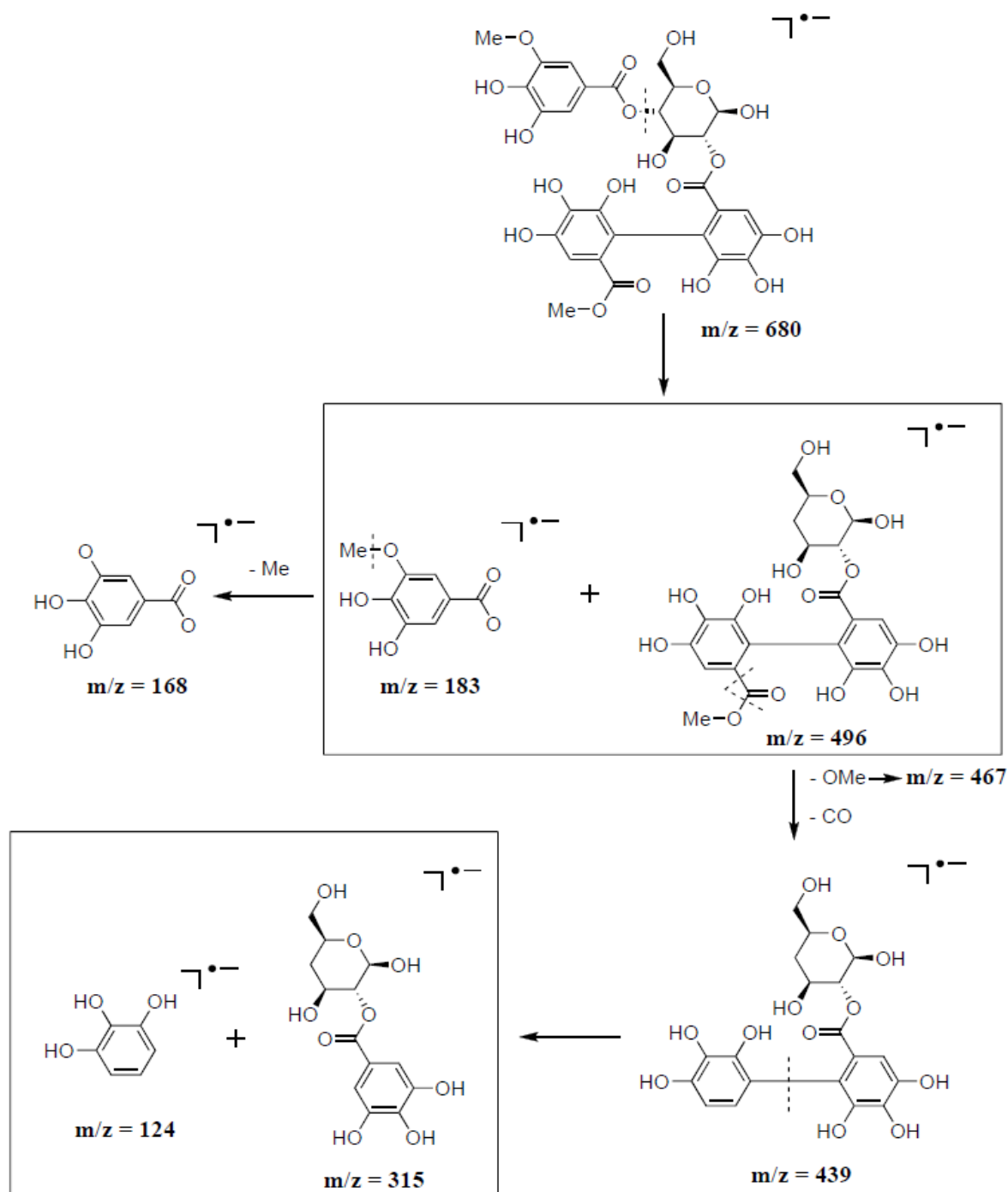


Abb. 234: Strukturvorschlag und Fragmentierungspfade für die während der Methanolyse der Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* intermediär auftretende Tanninspezies, basierend auf der von Körner vorgeschlagenen Struktur für eine klassische Ellagitanninstruktur

Für eine detaillierte Strukturaufklärung wäre eine NMR-spektroskopische Untersuchung von besonderem Wert, wofür eine Reinisolierung ausreichender Mengen der Verbindung mit $m/z = 680$ aus dem intermediären Methanolysat erfolgen müsste. Das diesbezügliche Trennproblem gestaltet sich im Vergleich zu der im Rahmen der vorliegenden Arbeit realisierten Reinisolierung der finalen Tanninspezies allerdings deutlich schwieriger, da zu dem intermediären Zeitpunkt der maximalen Bildung der gesuchten Verbindung die methanolytische Spaltung der Depsidbindungen der Tanninmischung noch bei weitem nicht komplett abgelaufen ist und infolgedessen noch eine erhebliche Vielfalt an strukturell ähnlichen Verbindungen in der Mischung vorliegt, die von der gesuchten Verbindung zu trennen sind.

5.2.3 Chromatographisches Trennverhalten der Tanninfraktionen

Die Nutzung des eigentlich für gelchromatographische Anwendungen entwickelten Säulenmaterials Sephadex LH-20 für eine adsorptive Trennung von Tanninmischungen wird seit den Arbeiten von NISHIZAWA ET AL., 1982 häufig eingesetzt. Die dabei maßgeblichen Wechselwirkungen sind nicht vollständig verstanden, hängen aber zu großen Teilen mit spezifischen Interaktionen phenolischer Systeme mit dem Säulenmaterial zusammen.

Ein Vergleich des Elutionsverhaltens der einzelnen Tanninfraktionen an der Sephadex LH-20-Säule in Abb. 112 mit ihrem korrespondierenden Laufverhalten an einer RP-18-HPLC-Säule in Abb. 113 belegt tendenziell eine Korrelation zwischen der Retention durch adsorptive Wechselwirkungen mit Sephadex LH-20 und dem zunehmend unpolaren Charakter der Verbindungen. Unter Berücksichtigung der LC-MS/MS-Resultate aus Abschnitt 4.3.1.2 ist zudem zu konstatieren, dass diese Zunahme der Retentionszeit gleichzeitig mit einem steigenden Galloylierungsgrad und damit mit einer zunehmenden Molekülmasse einhergeht, womit die beobachtete Elutionsreihenfolge der Tanninspezies von einer Sephadex LH-20-Säule exakt gegenläufig zu dem sonst genutzten Gelfiltrationsprinzip dieser Säule auftritt.

Eine tiefergehende Analyse der LC-MS/MS-Chromatogramme der einzelnen Tanninfraktionen ergibt darüber hinaus, dass neben der reinen Molekülgröße oder der Anzahl der in einer Spezies enthaltenen Galloylgruppierungen auch deren konkrete Anordnung erheblichen Einfluss auf das Laufverhalten nimmt. So können, wie bereits in Abschnitt 5.2 besprochen, im entsprechenden LC-MS/MS-Chromatogramm von TaF1 alle 5 Konstitutionsisomere von Monogalloylglukose in separaten Peaks erkannt werden. In diesem Chromatogramm tritt als Hauptkomponente von TaF1 eine Isomerenmischung von

Trigalloylglukosen mit mehreren ineinander übergehenden Peaks auf. Angesichts der Tatsache, dass bei methanolytischer Spaltung der Depsidbindungen der Gallotanninmischung ausschließlich das Isomer 1,2,6-O-Trigalloyl- β -D-Glukose als Trigalloylglukose bestehen bleibt, ist stark davon auszugehen, dass alle anderen detektierbaren Isomere Depsidbindungen beinhalten und sich nicht etwa bezüglich der Veresterungsposition an der Glukose unterscheiden.

In diesem Kontext fällt ins Auge, dass TaF1 einen einzelnen, symmetrischen Peak für eine Tetragalloylglukose enthält, wohingegen die Mehrzahl der Tetragalloylglukosen als Isomerengemisch im LC-MS/MS-Chromatogramm von TaF2 beobachtet werden. In analoger Weise beinhaltet wiederum das Chromatogramm von TaF2 nur einen einzelnen, symmetrischen Peak für eine Pentagalloylglukose, während eine breite Palette von Pentagalloylglukosen in der später eluierten Tanninfraktion TaF3 nachweisbar ist. Das markant abweichende Elutionsverhalten und die symmetrische Peakform sprechen in beiden Fällen dafür, dass ein spezielles Isomer einer Tetra- bzw. Pentagalloylglukose weniger stark mit dem Säulenmaterial Sephadex LH-20 interagieren kann und daher deutlich eher eluiert wird als die übrigen Isomere. Diese speziellen, eher eluierenden Isomere lassen sich auch unter Berücksichtigung der Retentionszeiten an der RP-18-HPLC eindeutig als die depsidbindungsfreien Tanninspezies 1,2,3,6-O-Tetragalloyl- und 1,2,3,4,6-O-Pentagalloyl- β -D-Glukose identifizieren. Daher ist es offenkundig, dass die Interaktion isomerer Tanninspezies mit Sephadex LH-20 durch einen Gehalt an depsidbindungsvermittelten Digalloyleinheiten verstärkt wird.

Aus den vorgenannten Überlegungen folgt, dass die Tanninfraktionen TaF1 und TaF2 neben den erwähnten speziellen depsidbindungsfreien Verbindungen ausschließlich depsidbindungshaltige Tanninspezies mit mindestens zwei freien OH-Gruppen am jeweiligen Glukose-Kern enthalten, wobei die Anzahl der freien Glukose-OH-Gruppen für TaF1 durchschnittlich höher ist als für TaF2. Die Tanninfraktionen TaF3 und TaF4 enthalten folglich ausschließlich Tanninspezies mit Depsidbindungen, die kaum noch freie OH-Gruppen an der Glukose aufweisen dürften. Aus Abschnitt 4.3.1.1 wird ersichtlich, dass das Laufverhalten von TaF1 und TaF2 an Sephadex LH-20 so unterschiedlich ausfällt, dass eine klare Abtrennung beider Fraktionen möglich ist, während der Übergang von TaF3 zu TaF4 graduell erfolgt. Dieses Phänomen spricht dafür, dass einerseits eine zunehmende Anzahl freier OH-Gruppen am Glukose-Kern die attraktiven Wechselwirkungen zwischen Tannin und Säulenmaterial drastisch schwächt und dass andererseits bei vollständiger Veresterung des Glukose-Kerns die

Anzahl der depsidgebundenen Galloyleinheiten nur noch einen schwachen Effekt auf die Bindungsstärke zum Säulenmaterial hat.

Die Summe dieser strukturellen Einflüsse auf die Interaktionsstärke zwischen Tanninspezies und Sephadex LH-20 begründet die bereits in Abb. 113 zu erkennenden Abweichungen der Elutionsreihenfolge gegenüber dem korrespondierenden Trennverhalten an einer RP-HPLC-Säule. Diese Diskrepanzen bilden wiederum die Grundlage für die verfeinerte Trennung der gewonnenen Tanninfraktionen mithilfe semi-präparativer HPLC an einer RP-8-Säule, wie sie in Abschnitt 4.3.1.3 dargelegt ist.

5.2.4 Besonderheiten des Löslichkeitsverhalten der Methanolyseprodukte

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verfolgte Aufarbeitungsstrategie der Methanolyseprodukte der Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* beruht im Wesentlichen auf dem empirischen Protokoll von CHEN & HAGERMAN, 2004 zur Gewinnung von PGG aus einer Gallotanninmischung, deren Herkunft nicht exakt spezifiziert wird. Im Unterschied zu der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gallotanninmischung enthielt die in der genannten Publikation studierte Tanninmischung jedoch annähernd ausschließlich auf PGG als depsidbindungsfreier Spezies basierende Strukturen, sodass nach der Methanolyse PGG, Gallussäure und Methylgallat, nicht jedoch 3GG und 4GG in der Reaktionsmischung enthalten waren, was das Trennproblem in der vorliegenden Arbeit komplexer gestaltet.

Das Protokoll von CHEN & HAGERMAN, 2004 beschreibt zunächst eine Extraktion mit Diethylether, bei welcher gemäß der Resultate aus Abschnitt 4.3.2.3 lediglich Methylgallat in die etherische und alle anderen Spezies in die wässrige Phase überführt werden. Im Anschluss erfolgt eine zweite Extraktion der wässrigen Phase mit Essigsäureethylester, um im Falle von CHEN & HAGERMAN, 2004 die deutlich polarere Gallussäure von der einzig verbliebenen Komponente PGG zu trennen, wobei PGG in der organischen Phase vorzufinden ist und nach Lösungsmittelaustausch in Wasser langsam ausfällt. Interessanterweise wird durch diesen Extraktionsschritt in der vorliegenden Arbeit ebenfalls ausschließlich die Gallussäure entfernt, sodass in diesem Fall jedoch weiterhin ein komplexes Gemisch aus 3GG, 4GG und PGG in der organischen Phase zurückbleibt (vgl. Abb. 129). Nichtsdestotrotz führt der anschließende Austausch des Solvens gegen Wasser zum spezifischen Ausfällen von PGG (vgl. Abb. 130), was einen bemerkenswerten Hinweis auf die Bedeutung von Gallussäure für die Löslichkeit von PGG in wässriger Umgebung liefert und insoweit deutlich über die Erkenntnis von CHEN & HAGERMAN, 2004, dass reine PGG aus wässriger Lösung präzipitiert, hinausgeht.

Da die beobachtete Fällung von PGG einzig durch die Entfernung von Methylgallat und Gallussäure in den vorgelagerten Extraktionsstufen induziert wird, ist eine detaillierte Betrachtung des Verhaltens von Mischungen aus reiner PGG mit je einer der beiden Komponenten angebracht. Wie in Abschnitt 4.3.2.7 dargelegt, ist die Löslichkeit von PGG in solchen Systemen stark von der Temperatur und der relativen Konzentration der im Gemisch vorliegenden Gallussäure bzw. des Methylgallats abhängig. Während oberhalb von 36 °C PGG auch ohne Zusätze in Wasser löslich ist, was natürlich insbesondere in Hinblick auf einen Einsatz unter physiologischen Bedingungen von großer Relevanz ist, tritt bei Abkühlung des Systems unter diese Temperatur eine makroskopisch sichtbare Fällung ein, wobei die kritische Temperatur für diesen Übergang mit steigender Gallussäure- oder Methylgallatkonzentration zu niedrigeren Werten verschoben wird. Dabei belegen die entsprechenden Untersuchungen einen spezifisch stärker ausgeprägten Einfluss von Methylgallat, sodass gegenüber Gallussäure geringere Mengen zugesetzt werden müssen, um vergleichbare Senkungen der Präzipitationstemperatur hervorzurufen. In großem Überschuss dieser Zusätze wird selbst bei Raumtemperatur keine Fällung von PGG beobachtet.

Die beiden anderen Methanolyseprodukte 3GG und 4GG bleiben ohne weitere Auftrennung in Lösung. Bei Reinisolierung der einzelnen Verbindungen mithilfe semi-präparativer HPLC wird aber auch in diesen Fällen eine schrittweise Präzipitation aus wässriger Umgebung beobachtet (vgl. Abb. 141). Insgesamt gesehen ergeben sich daher starke Hinweise darauf, dass intermolekulare Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Tanninspezies für die Löslichkeit komplexer Tanninmischungen in wässriger Umgebung verantwortlich sind. Die Löslichkeit wird in jedem Fall durch Zugabe eines unpolaren Cosolvens, wie etwa Methanol, wieder hergestellt, was eine Identifikation dieser Interaktionen als hydrophobe Wechselwirkungen plausibel erscheinen lässt.

Allein die Polaritätsunterschiede können das unterschiedliche Präzipitationsverhalten reiner Tanninspezies im Vergleich zu Mischungen allerdings nicht begründen. Vielmehr müssen Symmetriewägungen berücksichtigt werden. Dafür spricht einerseits, dass aus der Mischung der strukturell sehr ähnlichen Verbindungen 3GG, 4GG und PGG spezifisch PGG-Moleküle untereinander eine zur Fällung führende Interaktion miteinander eingehen, und andererseits, dass 3GG und 4GG erst nach Trennung beider Komponenten voneinander zu einer solchen Interaktion befähigt sind. Letztgenannte Beobachtung suggeriert, dass die entstehenden Interaktionen nur für die Reinverbindungen eine Symmetrie zulassen, welche eine periodische Fortsetzung ermöglicht, die zur Präzipitation großer, unlöslicher Objekte führt, während Interaktionen verschiedener Tanninspezies keine analog fortsetzbare Symmetrie generieren

und daher zu räumlich begrenzten, möglicherweise kolloidal in Lösung bleibenden Strukturen führen.

Die Resultate zu Mischungen aus PGG und Gallussäure bzw. Methylgallat unterstützen diese Hypothese. Die ausgeprägte Abhängigkeit des Fällungsverhaltens von PGG von der Konzentration der zugesetzten Komponente verweist eindeutig auf einen systematischen Zusammenhang zwischen gesteigerter Löslichkeit und Zunahme der Interaktionen zwischen PGG und Gallussäure bzw. Methylgallat. Unter Berücksichtigung der Strukturen dieser Verbindungen ist es weiterhin plausibel, attraktive Wechselwirkungen zwischen den phenolischen Ringen der einzelnen Komponenten für diese Interaktionen verantwortlich zu machen. Das stark differierende Extraktionsverhalten von Methylgallat und Gallussäure gegenüber PGG demonstriert, dass es sich im Fall der Gallussäure um einen Assoziationsprozess mit einer deutlich hydrophileren Verbindung handelt, wohingegen im Falle des Methylgallates auf diesem Wege eine markant hydrophobere Verbindung mit PGG in Wechselwirkung tritt. Beide Prozesse führen jedoch zu einer Reduktion der PGG-Fällung, womit die veränderte Hydrophobie der gebildeten Strukturen keinesfalls ausschlaggebend sein kann. Vielmehr ist anzunehmen, dass für die Fällung von PGG spezifische PGG-PGG-Kontakte notwendig sind, welche durch die Assoziation von PGG mit Gallussäure bzw. Methylgallat unterbunden werden.

Auf Basis dieser Hypothese ließe sich die Löslichkeit von Tanninspezies im Kontext kompetitiver Prozesse bezüglich gemeinsamer Interaktionsstellen zwischen identischen und verschiedenen Tanninspezies begreifen, was auch zu den in Abschnitt 4.3.2.7 festgestellten Konzentrationsabhängigkeiten passt.

5.2.5 Zusammenhänge zwischen Tanninstruktur und anti-amyloiden Effekten auf GnRH-Antagonisten

Aufgrund der positiven Resultate bezüglich der aggregations-inhibierenden Wirkung der Gallotanninmischung wurden die strukturverändernden Effekte für alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten Tanninfraktionen und -teilstoffe, sowie für die drei methanolytisch gewonnenen finalen Tanninspezies mittels ATR-FTIR-Spektroskopie und der neu entwickelten Kongorottitration im Detail untersucht (vgl. Abschnitte 4.4.1.3 & 4.4.3).

Im Zuge der durchgeführten Kongorottitrationen zeigen alle Tanninfraktionen oder -spezies eine stark hemmende Wirkung auf die Amyloidbildung von Cetrorelix, Ozarelix und Teverelix. Die Effizienz dieses Prozesses unterscheidet sich allerdings erheblich zwischen den

einzelnen Tanninspezies. In den meisten Fällen wird zwar bei hohem Tanninüberschuss im Verhältnis zum GnRH-Antagonisten durchaus eine annähernd vollständige Unterdrückung der Amyloidbildung detektiert, die Abhängigkeit der erzielten Wirkung von der dafür notwendigen Tanninmenge weist jedoch große Unterschiede auf.

Um diesen Effekt zu veranschaulichen, ist in Abb. 235 jeweils die bewirkte Reduktion des Amyloidgehaltes bei einem Tannin/GnRH-Antagonist-Massenverhältnis von 0,5 : 1 vergleichend dargestellt. Bei diesem Massenverhältnis wird in keinem Fall bereits das Plateau der Maximalwirkung erreicht, sodass ein Vergleich der relativen Effizienzunterschiede möglich ist. In jedem Fall ist jedoch eine annähernd komplette Hemmung der Amyloidbildung bei Zugabe größer Mengen der entsprechenden Tanninkomponente möglich.

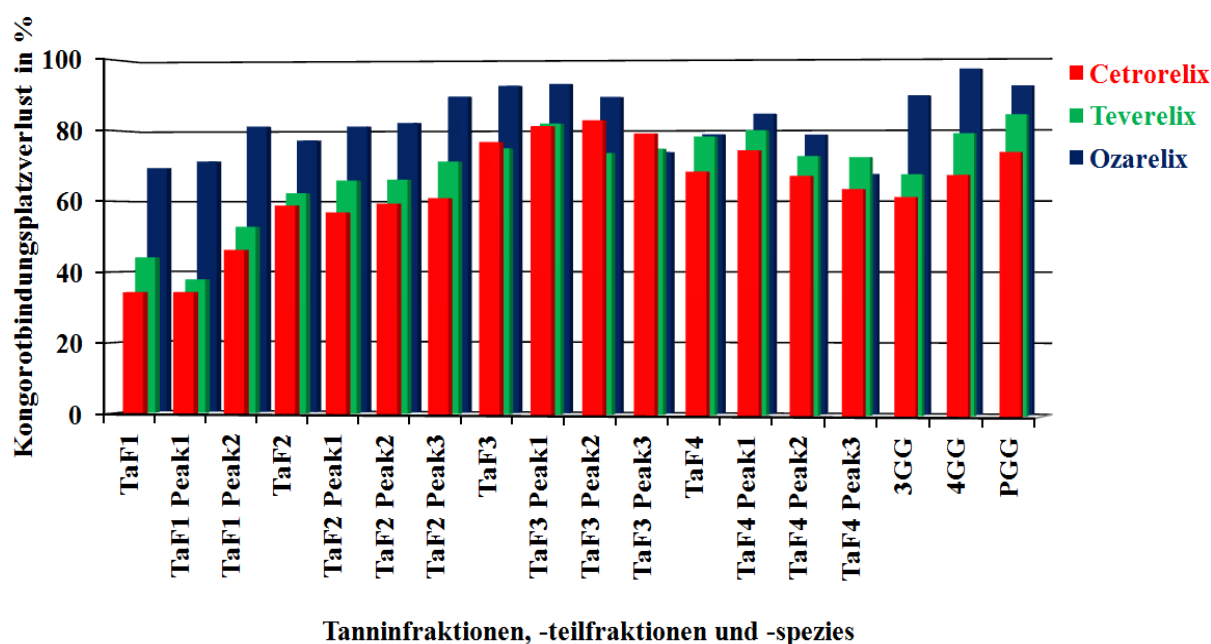


Abb. 235: Übersicht der erzielten Reduktionen des Amyloidgehaltes von GnRH-Antagonisten für die einzelnen Tanninfraktionen, -teilmoleküle und -spezies bei einem Tannin/Peptid-Massenverhältnis von stets 0,5 : 1

Nicht enthalten in Abb. 235 sind Angaben für reine Gallussäure als potentiellern Inhibitor, da für keinen der untersuchten GnRH-Antagonisten eine signifikante Beeinflussung durch Gallussäure für Massenverhältnis bis zu 3 : 1 gegenüber dem jeweiligen Peptid nachweisbar ist und somit keine hemmende Wirkung auf die Amyloidbildung festzustellen ist.

Ein Vergleich der dargestellten Resultate bezogen auf die GnRH-Antagonisten Cetorelix, Teverelix und Ozarelix macht spontan deutlich, dass für Ozarelix grundsätzlich eine stärkere Reduktion des Amyloidgehaltes hervorgerufen wird als für Cetorelix und Teverelix, zwischen denen selbst nur geringfügige Differenzen zu erkennen sind. Diese Beobachtung

lässt sich plausibel auf die bereits auf Basis der IR-spektroskopischen Ergebnisse konstatierte, systematisch schwächere Stabilisierung der amyloid-typischen β -Faltblattstrukturen von Ozarelix zurückführen (vgl. Abschnitt 5.1.2), wodurch eine Störung der Aggregatstruktur des Peptides erleichtert ist.

Die einzelnen chromatographisch getrennten Tanninfraktionen sind in Abb. 235 geordnet nach ihrer Elutionsreihenfolge an Sephadex LH-20 bzw. für die korrespondierenden Teilfraktionen nach der Elutionsreihenfolge an der semi-präparativen RP-8-Säule abgebildet. Es zeigt sich, dass die inhibitorische Wirkung von TaF1 über TaF2 zu TaF3 systematisch zunimmt, was zunächst eine Korrelation zwischen zunehmender Galloylierung der enthaltenen Tanninspezies und hervorgerufener Amyloidreduktion suggeriert. Wie in Abschnitt 4.4.1.3 dargestellt, belegen auch die ATR-FTIR-spektroskopischen Analysen von Komplexen der drei GnRH-Antagonisten mit den unterschiedlichen Tanninfraktionen anhand der korrespondierenden Abnahme der β -Faltblatt-typischen Form der Amid I-Bande eine zunehmende anti-amyloide Wirkung in der Reihenfolge TaF1 < TaF2 < TaF3.

Für den Übergang von TaF3 zu TaF4 wird demgegenüber in Abb. 235 eine Umkehr dieses Trends beobachtet, sodass für alle GnRH-Antagonisten Teilfraktionen von TaF3 effizientere Inhibitoren der Aggregation darstellen als Teilfraktionen von TaF4, obwohl der durchschnittliche Galloylierungsgrad der Spezies von TaF4 höher liegt als derjenige der Tanninspezies von TaF3 (vgl. Abschnitt 5.2.3). Dieses veränderte Verhalten deutet darauf hin, dass für die hochgalloylierten Verbindungen von TaF4 zusätzliche Effekte auftreten, die sich kontraproduktiv in Hinblick auf das amyloid-hemmende Potential der Tanninspezies auswirken. Bestätigt wird diese Beobachtung durch das Verhalten der jeweils mittels semi-präparativer HPLC gewonnenen Teilfraktionen. Während für die Teilfraktionen von TaF1 eine deutliche Steigerung der anti-amyloiden Wirkung der später eluierten Teilfraktion gegenüber der früher eluierten zu verzeichnen ist, kehrt sich dieser Trend für die Teilfraktionen von TaF4 um.

Betrachtet man das Verhalten der Methanolyseprodukte 3GG, 4GG und PGG, so wird für Cetrorelix und Teverelix eine eindeutige Zunahme des aggregations-inhibierenden Effektes mit steigendem Galloylierungsgrad ersichtlich. Für Ozarelix ist hingegen kein eindeutiger Trend zu erkennen, wobei in diesem konkreten Fall zu berücksichtigen ist, dass die Amyloidstruktur in Gegenwart aller Methanolyseprodukte um mehr als 90 % verringert vorliegt, sodass eine Abstufung prinzipiell schwieriger zu erfassen ist.

Unter fernerer Berücksichtigung der Resultate zur Selektivität der Interaktion von Tanninspezies mit Cetrorelix aus Abschnitt 4.4.4 lassen sich daher nachfolgende

Zusammenhänge zwischen Struktur und anti-amyloider Wirkung von Gallotanninspezies herstellen.

So ist für Gallussäure, Methylgallat und alle 5 Konstitutionsisomere der Monogalloylglukosen anhand der in Abb. 179 und Abb. 181 veranschaulichten Resultate keinerlei stabile Interaktion mit Cetrorelix nachweisbar und dementsprechend auch keine aggregationsinhibierende Wirkung anzunehmen, was im Fall von Gallussäure auch durch die Kongorotitationsergebnisse bekräftigt wird. In Hinblick auf Digalloylglukosen ist die Datenlage für eine fundierte Analyse unzureichend, jedoch kann für Tri-, Tetra- und Pentagalloylglukosen mit steigendem Galloylierungsgrad eine zunehmende Aggregationshemmung der GnRH-Antagonisten konstatiert werden. Die Selektivitätsuntersuchungen an Methanolyseprodukten in Abb. 181 belegen diesbezüglich, dass in einer depsidbindungsfreien Mischung stets die am höchsten galloylierte Verbindung bevorzugt mit dem Peptid interagiert, wenn die Tanninkomponenten insgesamt in einem deutlichen Überschuss gegenüber dem Peptid vorliegen. Darüber hinaus demonstrieren die Interaktionsstudien mit den Tanninfraktionen TaF1 und TaF2 in Abb. 179 und Abb. 180, dass depsidbindungsfreie Tetra- bzw. Pentagalloylglukosen selbst dann vorrangig mit Cetrorelix wechselwirken, wenn parallel depsidbindungshaltige, jedoch niedriger galloylierte Tanninspezies in der Mischung existieren. Letztgenannte Erkenntnis führt im Zusammenhang mit der für TaF4 beobachteten relativen Abnahme der anti-amyloiden Wirkung besonders hoch galloylierter Spezies zu der Vermutung, dass das Strukturmotiv der Depsidbindung selbst weder für die anti-amyloide Wirkung unbedingt erforderlich, noch in dieser Hinsicht per se wirkungsförderlich ist. Gleichzeitig geht aus Abb. 235 klar hervor, dass mithilfe der stark depsidbindungshaltigen Tanninfraktion TaF3 die stärkste Reduktion des Amyloidgehaltes von GnRH-Antagonisten zu erzielen ist und der dabei erreichte Effekt auch deutlich höher als bei der Nutzung von PGG, als der maximal galloylierten, depsidbindungsfreien Tanninspezies, ausfällt.

Sowohl für einige flavonoid-basierte Strukturen mit phenolischen OH-Gruppen [Meng et al., 2010], als auch für in gewisser Weise mit Glukose vergleichbare Inositstrukturen mit aliphatischen OH-Gruppen [McLaurin et al., 2000] konnte bereits gezeigt werden, dass eine anti-amyloide Beeinflussung pathologischer Peptidaggregate durch diese Substanzen in Abhängigkeit von der konkreten Anordnung der OH-Gruppen auftritt. Daher ist auch für Galloylglukosen eine Abhängigkeit von der durch die konkrete Veresterungsstruktur vorgegebene Konstellation der verschiedenen OH-Gruppen äußerst wahrscheinlich. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse sprechen sehr deutlich dafür, dass die Wirkung dabei fast ausschließlich auf die phenolischen OH-Gruppen der Gallussäureeinheiten

zurückzuführen ist, wobei ferner die festgestellte Unwirksamkeit von Gallussäure, Methylgallat sowie von Monogalloylglukosen suggeriert, dass für den anti-amyloiden Effekt mehrere Gallussäureeinheiten in einer bestimmten Anordnung zueinander benötigt werden. Die besonders positiven Effekte der Tanninfraktion TaF3 deuten darauf hin, dass ein gewisser Anteil an Depsidbindungen solche Anordnungen begünstigen kann, während die nachlassende spezifische Wirksamkeit der Teilfraktionen der Tanninfraktion TaF4 den Verdacht nahe legt, dass ein zu hoher Anteil an Depsidbindungen wiederum restriktiv auf solche Anordnungen wirkt und daher die erforderliche Interaktion mit dem Peptid behindert.

5.2.6 Inhibitoren der Aggregation des GHRH-Analogons

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erweist sich das Aggregationsverhalten des GHRH-Analogons als ein klassischer Amyloidbildungsprozess, der im Vergleich zu der hauptsächlich betrachteten Aggregation von GnRH-Antagonisten allerdings zu erheblich schwächer stabilisierten Peptidaggregaten führt (vgl. Abschnitt 5.1.4). Als potentielle Aggregationsinhibitoren wurden daher zunächst ausschließlich Substanzen untersucht, die gemäß dem *Federal Food, Drug, and Cosmetic Act* in den USA als *GRAS* eingestuft sind, um ggf. eine Übertragung in eine pharmazeutische Formulierung zu vereinfachen.

Die in Abschnitt 4.2.3 beschriebenen Resultate verdeutlichen, dass kurzkettige Di- und Tricarbonensäuren, wie Zitronensäure, Weinsäure oder auch Bernsteinsäure, kaum einen Effekt auf die amyloiden Strukturmerkmale des GHRH-Analogons hervorrufen. Allein Bernsteinsäure zeigt dabei überhaupt eine signifikante Wirkung, die jedoch äußerst gering ausfällt. Im Gegensatz dazu lassen sich für die von saccharidischen Strukturen abgeleiteten Verbindungen Mannit, Gluconsäure und L-Ascorbinsäure teilweise gravierende anti-amyloide Effekte auf das GHRH-Analogon nachweisen.

Eine besonders große Reduktion des Amyloidanteils wird in Gegenwart von 10 mM L-Ascorbinsäure verzeichnet. Sowohl mithilfe der Sonde ThioT als auch mit der Sonde Kongorot wird in diesem Fall eine Verringerung solcher Aggregatstrukturen um ca. 60 % in einer GHRH-Analogon-Lösung mit einer Peptidkonzentration von 0,2 mg/ml bei pH 7,0 und einem physiologischen Natriumchloridgehalt von 0,9 % nach 1 h Inkubation bei RT gemessen (vgl. Abb. 94 & Abb. 95). Die hervorgerufene Wirkung nimmt mit der Zeit jedoch deutlich ab, sodass schon nach wenigen Tagen ein drastischer Anstieg des Amyloidgehaltes mithilfe der genannten Sonden erkennbar ist (vgl. Abb. 96). TEM-Aufnahmen bestätigen diese Beobachtungen, da einerseits wenige Stunden alte Proben des GHRH-Analogons in

Gegenwart von L-Ascorbinsäure kaum fibrilläre Strukturen aufweisen und andererseits mehrere Tage alte Proben analoger Formulierungen eine drastische Zunahme an Peptidfibrillen zeigen (vgl. Abb. 107).

Im Zusammenhang mit der amyloiden Aggregation von A β im Zuge von *Morbus Alzheimer* ist eine Verringerung der zellulären Schäden durch Ascorbinsäure seit längerem bekannt, wird allerdings in der Regel pathomechanistisch im Kontext ihrer antioxidativen Wirkung diskutiert [Yallampalli et al., 1998]. Neuere Studien kommen demgegenüber aber zu dem Schluss, dass durch Ascorbinsäure gleichzeitig auch eine signifikante Verlangsamung der Oligomerisierung von A β bewirkt wird [Murakami et al., 2011]. Es ist daher anzunehmen, dass der zeitabhängige Effekt von L-Ascorbinsäure auf die Aggregation des GHRH-Analogons ebenfalls durch einen inhibitorischen Eingriff in die Oligomerisierung des Peptides zu erklären ist, durch welchen der Prozess zwar verlangsamt, nicht aber grundlegend gestoppt wird.

Die Resultate zur Wirkung von Gluconsäure und Mannit stützen diese Hypothese, da in beiden Fällen eine besonders hohe Wirkung in Gegenwart von 5 Masse-% des entsprechenden Additivs beobachtet wird, die zeitlich jedoch ebenfalls abnimmt. Für Gluconsäure zeigt sich dabei, dass der Wirkungsverlust in Gegenwart dieser hohen Additivmenge deutlich geringer ausfällt als in Gegenwart niedrigerer Konzentrationen (vgl. Abb. 101).

Eine offenkundig andersartige Beeinflussung des Aggregationsverhaltens des GHRH-Analogons wird durch Embonsäure und Benzylalkohol hervorgerufen. Die stark hydrophobe Embonsäure selbst ist in wässriger Umgebung nicht löslich, sodass Benzylalkohol als Löslichkeitsvermittler benötigt wird. Es ist daher nicht verwunderlich, dass dieses System in wässriger Umgebung bereits ohne das Peptid Mizellen ausbildet, was bei Verwendung der Hydrophobie-Sonde ANS zu einem Blindwert und einer spektralen Verschiebung der Fluoreszenzemission führt (vgl. Abschnitt 4.2.3.2). Interessanterweise werden diese Mizellen in Gegenwart des Peptides jedoch in strenger Abhängigkeit zur Peptidkonzentration so verändert, dass die Fluoreszenzemission der Sonde ANS drastisch gesteigert wird. Im Gegensatz dazu belegen weder die Untersuchungen mit der Sonde Kongorot noch die korrespondierenden TEM-Aufnahmen aus Abschnitt 4.2.4.2 eine signifikante Verringerung der amyloid-typischen Fibrillen. Angesichts der strukturellen Besonderheiten des Peptides ist es plausibel anzunehmen, dass der hydrophobe N-Terminus mit den Embonsäure/Benzylalkohol-Mizellen in der Form interagiert, dass der Großteil des Peptides in der wässrigen Phase verbleibt, wohingegen der N-Terminus selbst in das hydrophobe Innere der Mizellen ragt. Dadurch fungiert das Peptid selbst als Konstituent der Mizellen, was die

Abhängigkeit der mizell-typischen ANS-Fluoreszenz von der Peptidkonzentration begründet. Die Amyloidbildung wird dadurch jedoch nicht wirksam unterbunden.

Embonsäure wurde in früheren Arbeiten auch als Komplexpartner für den GnRH-Antagonisten Cetrorelix untersucht, wobei allerdings kein Löslichkeitsvermittler zum Einsatz kam, sondern feste Fällungsprodukte charakterisiert wurden [Rattei, 1995; Rattei, 2002]. Die in diesem Zuge aufgenommenen ATR-FTIR-Spektren zeigen die typischen Charakteristika einer amyloiden Struktur, sodass auch hierbei keine grundlegende Störung der Aggregation zu vermuten ist.

5.3 Beeinflussung des Liberationsverhaltens von GnRH-Antagonisten durch Partnermoleküle

5.3.1 Entwicklung einer Dialyseliberationsapparatur zur Untersuchung des Freisetzungsverhaltens mobiler Peptidspezies

Die zentrale Zielstellung der vorliegenden Arbeit besteht in der Aufklärung strukturbildender Prozesse auf molekularer Ebene, um eine gezielte Generierung von Formulierungen aus GnRH-Antagonisten und geeigneten Partnermolekülen zu ermöglichen, welche eine gesteuerte Freisetzung der Peptide in aktiver Form über einen Zeitraum von Wochen bis hin zu Monaten gewährleisten. Es ist daher von herausragender Bedeutung, über ein adäquates Verfahren zur Untersuchung der zeitabhängigen Freisetzung solcher Peptidspezies aus den erzeugten Wirkstoffformulierungen zu verfügen.

In früheren Arbeiten wurde zu diesem Zweck häufig auf das Prinzip der statischen Liberation zurückgegriffen (vgl. Murgas, 1997; Pietzsch, 2009; Schamberger, 2009; Beil, 2012(1); Schamberger, 2014). Bei diesem Verfahren wird die zu analysierende Formulierung des GnRH-Antagonisten in fester Form in einem Zentrifugenröhrchen vorgelegt, mit einem definierten Volumen des Liberationsmediums versetzt und anschließend mit einem Magnetührstab kontinuierlich gerührt, wodurch eine Suspension aus Wirkstoffformulierung und Liberationsmedium erzeugt wird. Nach bestimmten Zeitintervallen erfolgt jeweils ein Zentrifugationsschritt und eine Bestimmung der im Überstand befindlichen GnRH-Antagonist-Konzentration, welche gleichzeitig als freigesetzter Wirkstoffanteil betrachtet wird. Die auf diesem Wege erhaltenen Freisetzungsergebnisse berücksichtigen dementsprechend jedweden nicht-zentrifugierbaren Peptidanteil als potentiell wirksame Komponente.

Bereits MAJI ET AL., 2008 wiesen darauf hin, dass dieser Ansatz in Anbetracht des Aggregationsverhaltens von GnRH-Antagonisten wenig zielführend ist, da auch große fibrilläre Strukturen dieser Peptide nicht zentrifugierbar, dabei jedoch gleichfalls aufgrund ihrer vernachlässigbar geringen Mobilität auch nicht wirksam sind. Vielmehr müsse man die im Gleichgewicht mit den aggregierten Anteilen vorliegenden, monomeren Bestandteile separat erfassen, um ein realistisches Bild von der zeitabhängigen Freisetzung potentiell wirksamer Peptidspezies zu erhalten. Um ihre Überlegung zu untermauern, zeigten sie anhand eines einfachen Dialyseexperimentes über 35 Tage gegen 5 %ige Mannit-Lösung, dass zahlreiche GnRH-Analoga bereits ohne zusätzliche Komplexkomponenten eine erhebliche Freisetzungverzögerung bezogen auf ihre monomeren Bestandteile aufweisen und daher die

amyloiden Fibrillen dieser Peptide quasi als inhärentes Depotsystem angesehen werden müssen.

Um den Erkenntnissen von MAJI ET AL., 2008 Rechnung zu tragen, wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein neuartiges Dialyseliberationsexperiment entwickelt, welches die zeitabhängige Passage des GnRH-Antagonisten durch eine 12 kDa-Membran als Freisetzungskriterium definiert. Der angegebene Wert für den MWCO ist damit ca. 8-mal so groß wie die GnRH-Antagonisten, sodass nur Monomere bzw. kleinste Oligomere als potentiell wirksame Spezies berücksichtigt werden.

Wie in Abschnitt 4.5.1.1 dargestellt, lässt die entwickelte Dialyseliberationsapparatur für die niedermolekulare Modellsubstanz Tyrosin die Bestimmung aussagekräftiger Werte mit einem hohen Maß an Reproduzierbarkeit zu. Die genannte Aminosäure ist in der Sequenz aller betrachteten GnRH-Antagonisten enthalten, weist dementsprechend auch Ähnlichkeiten zum Fluoreszenzverhalten der Peptide auf und bildet in gewissen Grenzen eine Reihe an potentiellen Interaktionsmöglichkeiten des Peptides mit den Materialien der Dialyseliberationsapparatur ab, die beispielsweise zu Adsorptionsphänomenen an der Cellulosemembran führen könnten. Auf der anderen Seite ist die Molekülmasse von Tyrosin um einen Faktor 8 kleiner als die der GnRH-Antagonisten und die Aminosäure besitzt freilich kein Potential zur Bildung großer Aggregate unter den betrachteten Solvensbedingungen, sodass ein Modell vorliegt, welches keine Liberationsverzögerung aufgrund der für die GnRH-Antagonisten zu erwartenden Aggregationsprozesse erfahren sollte.

Die entsprechenden Modelluntersuchungen aus Abschnitt 4.5.1.1 zeigen eindeutig, dass die relative Freisetzung der Aminosäure von der Absolutkonzentration unabhängig einem einheitlichen osmotischen Profil folgt, wobei eine asymptotische Annäherung der freigesetzten Konzentration an den Gleichverteilungszustand beobachtet wird. Dieser Prozess verläuft im Vergleich zu typischen Dialyseverfahren recht langsam, sodass er selbst für die niedermolekulare Substanz Tyrosin nach 7 Tagen noch deutlich vom Gleichgewichtszustand entfernt ist. Die Hauptgründe hierfür liegen einerseits in der verhältnismäßig kleinen Membranfläche und dem moderaten Verhältnis zwischen innerem und äußerem Volumen der Dialysekonstruktion von nur 1 : 8. Ein höheres Volumenverhältnis würde den Konzentrationsgradienten über die Membran zwar über einen größeren Abschnitt des Osmoseprozesses hoch halten, gleichzeitig würde die Quantifizierung des freigesetzten Peptidanteils aufgrund der verstärkten Verdünnung jedoch erschwert. Für eine Analyse des zeitlichen Ablaufes der Freisetzungssphänomene ist daher eine Gesamtexperimentdauer von 28 Tagen erforderlich.

Die Gegenwart von Chitosan beeinflusst die ermittelten Freisetzungskurven von Tyrosin nicht signifikant (vgl. Abb. 183), sodass davon auszugehen ist, dass die Permeabilität der Membran durch diesen wesentlichen Komplexpartner nicht beeinträchtigt wird.

Die in Abschnitt 4.5.1.2 wiedergegebenen Resultate zum pH-abhängigen Liberationsverhalten des GnRH-Antagonisten Cetrorelix verdeutlichen die überlegene Aussagekraft der mithilfe der neu-entwickelten Liberationsapparatur gewonnenen Daten gegenüber der bislang etablierten statischen Liberation. Während bei der statischen Liberation reine GnRH-Antagonisten ohne Komplexpartner selbst bei pH 7,0 stets als instantan freigesetzt erfasst werden [Schamberger, 2014], ermöglicht das Dialyseliberationsexperiment die Visualisierung der aufgrund der pH-Abhängigkeit des Aggregationsprozesses korrespondierend ebenfalls veränderte Freisetzungskinetik monomerer und oligomerer Peptidspezies aus den aggregierten Systemen. Das Freisetzungsverhalten von Cetrorelix bei pH 3,0 folgt dabei einer ähnlichen Kinetik wie Tyrosin, was indiziert, dass unter diesen Bedingungen die Freisetzung des Peptides nicht durch Aggregationsprozesse gestört wird. Bei allen höheren pH-Werten wird die Liberation zunehmend verzögert, wobei stets zwei zeitlich getrennte Phasen auffallen. In einer initialen Phase erfolgt eine verhältnismäßig rasche Freisetzung eines gewissen Anteils des Peptides, bevor eine stark verzögerte Freisetzung mit einem konstanten Anstieg über den gesamten Versuchszeitraum einsetzt. Der Anstieg der zweiten Phase ist dabei unabhängig vom pH-Wert für alle Messreihen oberhalb von pH 3,0 identisch, wohingegen der freigesetzte Peptidanteil der initialen Phase mit steigendem pH-Wert abnimmt.

Dieses Verhalten steht in Übereinstimmung mit den in Abschnitt 5.1 diskutierten Resultaten der pH-abhängigen Strukturuntersuchungen an GnRH-Antagonisten, denen zufolge die Aggregation sprunghaft zwischen pH 3,0 und pH 4,0 einsetzt. Der zweigeteilte Liberationsverlauf lässt sich in diesem Kontext wie folgt interpretieren. Zu jedem Zeitpunkt stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen aggregierten und daher immobilen Peptidanteilen einerseits und monomeren bzw. oligomeren und daher mobilen Peptidanteilen andererseits ein. In der initialen Phase des Experimentes wird der Liberationsverlauf durch die Osmose des im Gleichgewicht mobil vorliegenden Peptidanteiles dominiert, der offensichtlich mit steigendem pH-Wert abnimmt. Der beobachtete, lineare Anstieg der Freisetzungskurven in der zweiten Phase wird hingegen durch das Gleichgewicht zwischen aggregierten und mobilen Peptidspezies vorgegeben. Der Verlust an mobilen Peptidspezies infolge der Osmose wird in dieser Phase durch die Neubildung solcher Spezies aus den Aggregaten exakt kompensiert, wodurch der eigentlich für einen osmotischen Prozess zu erwartende asymptotische Kurvenverlauf durch eine Gerade ersetzt wird.

Bei der Betrachtung der erhaltenen Dialyseliberationskurven ist daher stets zu berücksichtigen, dass bei pH 3,0 einzig die Beeinflussung der Mobilität der monomeren Peptidspezies eines GnRH-Antagonisten ins Gewicht fällt. Bei allen höheren pH-Werten muss darüber hinaus zusätzlich die Beeinflussung der Aggregation des Peptides berücksichtigt werden.

5.3.2 GnRH-Antagonist-Komplexe mit Polysacchariden

Das kationische Polysaccharid Chitosan ist aufgrund seiner positiven pharmakologischen Eigenschaften eine beliebte Komponente in *drug delivery*-Systemen (vgl. Abschnitt 1.4.1) und wurde bereits in mehreren Arbeiten zur Erzeugung von Komplexen mit GnRH-Antagonisten, welche eine verzögerte Wirkstofffreisetzung aufweisen, verwendet [Pietzsch, 2009; Schamberger, 2009; Schamberger, 2014]. Untersuchungen mithilfe der statischen Liberation ergaben, dass die Freisetzung des Peptides von der Erosion des im Komplex vorhandenen Chitosans abhängt [Schamberger, 2014]. Strukturuntersuchungen konnten zudem belegen, dass in Komplexen aus Cetrorelix und Chitosan der GnRH-Antagonist amyloid aggregiert vorliegt und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Peptid und Polysaccharid ausgebildet werden [Beil, 2012 (1)].

In allen erwähnten Studien erfolgte die Komplexpräparation unter schwach basischen pH-Bedingungen, unter welchen Chitosan bereits selbst vollständig präzipitiert, sodass in diesen Fällen folglich unabhängig von einer spezifischen Interaktion zwischen Peptid und Chitosan das im Komplex vorzufindende Massenverhältnis zwischen Cetrorelix und Chitosan dem Ansatzverhältnis vor der Fällung entsprechen muss [Beil, 2012 (1)]. Es lässt sich daher auf Basis der vorliegenden Ergebnisse nicht eindeutig ergründen, inwieweit die auftretende Fällung beider Komplexkomponenten aufgrund einer stabilen Interaktion beider Komponenten miteinander zustande kommt, oder ob die amyloiden Cetrorelixfibrillen lediglich durch das ausfallende Chitosan mitgerissen werden und die existenten Wasserstoffbrückenbindungen in Hinblick auf die Depoteigenschaften des Systems kaum einen stabilisierenden Einfluss ausüben.

Eine Untersuchung der Freisetzungskinetik solcher Komplexe aus Chitosan und Cetrorelix mithilfe der Dialyseliberationsapparatur kann diesbezüglich die molekularen Prozesse exakter erfassen als die bisher etablierte statische Liberationsanordnung. Wie in den Abschnitten 4.5.2.1 und 4.5.2.2 gezeigt, wird das Freisetzungsverhalten dieser Komplexe einzig von der Aggregatstabilität der Peptidfibrillen beeinflusst. Der Komplexpartner Chitosan kann

unabhängig vom N-Acetylierungsgrad und unabhängig vom pH-Wert bei der Versuchsdurchführung keine maßgebliche Verzögerung der Wirkstofffreisetzung erzielen. Unter Berücksichtigung der Resultate von SCHAMBERGER, 2014 ist daher anzunehmen, dass die Chitosanmatrix die amyloiden GnRH-Antagonist-Fibrillen umgibt und in ein fällbares Netzwerk einschließt, was den Wirkstoff in zentrifugierbarer Form bindet. Durch die Erosion des Chitosans werden die amyloiden Fibrillen zunehmend freigelegt und lassen sich nicht mehr durch Zentrifugation abtrennen. Die Freisetzung membrangängiger, gering assoziierter Peptidspezies wird dadurch jedoch nicht signifikant modifiziert.

Da Nachweis von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Chitosan und Cetorelix lässt jedoch vermuten, dass die polysaccharidische Grundstruktur durchaus zu attraktiven Wechselwirkungen mit GnRH-Antagonisten in der Lage ist und daher möglicherweise auch zur Generierung stabiler Depotsysteme geeignet sein könnte. Die kationische Natur von Chitosan sollte hingegen aufgrund elektrostatischer Repulsion destabilisierend auf solche Komplexe wirken, sodass ein neutrales Polysaccharid eine bessere Stabilisierung herbeiführen könnte.

Aus dieser Überlegung werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Stärkekomponten als Modellsubstanzen für die Komplexierung von Cetorelix untersucht. Die ATR-FTIR-Resultate aus Abschnitt 4.4.1.1 demonstrieren diesbezüglich, dass auch für Systeme aus Cetorelix und neutralen Polysacchariden, wie Dextran, Amylose oder Stärke, bei neutralem pH-Wert Fällungen beobachtet werden, in denen die jeweils verwendeten Komponenten entsprechend ihres Massenverhältnisses im Ansatz nachzuweisen sind. Im Gegensatz zu Chitosan fallen diese Polysaccharide unter den genannten pH-Bedingungen selbst jedoch nicht aus, wodurch in diesen Fällen die Ursache der Präzipitation eindeutig in einer Interaktion zwischen Peptid und Partnermolekül bestehen muss.

Für Amylose ergibt sich aus den pH-abhängigen Untersuchungen aus Abschnitt 4.4.2.1 zudem, dass bereits bei pH 3,0 eine Interaktion mit anschließender Fällung zwischen Polysaccharid und GnRH-Antagonist stattfindet, auch wenn in diesem Fall nur ca. 30 % des Peptides gefällt werden, wohingegen bei Überschreiten des für die amyloide Aggregation von Cetorelix maßgeblichen pH-Wertes von 4,0 eine annähernd vollständige Ausfällung erfolgt. Bemerkenswerterweise liegt der im Komplex detektierbare Peptidanteile dabei stets in der amyloid-typischen Form vor. Diese Beobachtung verweist insbesondere angesichts der Ergebnisse bei pH 3,0 auf einen aggregationsförderlichen Effekt durch Amylose. Diese Erkenntnis wird zum einen durch die fluoreszenzspektroskopischen Ergebnisse aus Abschnitt 4.4.2.3 gestützt und zum anderen durch die beobachtbaren Dialyseliberationsprofile aus

Abschnitt 4.5.2.2. Besonders deutlich wird der Effekt der Stärkekomponten auf das Freisetungsverhalten von Cetrorelix anhand von Abb. 189 im Vergleich zu der reinen Peptid-Referenz bei pH 4,0. In Gegenwart der Stärkekomponten wird der zu Beginn des Experimentes mobil vorliegenden Peptidanteil, welcher sich in der initialen Phase verstärkter Freisetzung manifestiert, drastisch reduziert. Der Anstieg der daran anschließenden zweiten Freisetzungsphase entspricht hingegen dem Verhalten der amyloiden Fibrillen, wie es auch für die Peptidreferenz zu beobachten ist.

Die Rolle von Polysacchariden bei der Ausbildung amyloider Peptidstrukturen ist aufgrund der namensgebenden strukturellen Verwandtschaft beider Systeme seit der Entdeckung dieser Strukturen ein fester Bestandteil der wissenschaftlichen Debatte (vgl. Abschnitt 1.2.1). Bisher ist nicht eindeutig klar, ob auf Glukosederivaten basierende Polysaccharide pathologische Amyloidbildungen unterstützen. Einige Studien verweisen aber beispielsweise darauf, dass chitin-artige Polysaccharidablagerungen für Amyloid β aufgrund der ähnlichen Oberflächenstruktur die amyloide Aggregation beschleunigen könnten [Castellani et al., 2005; Castellani et al., 2007]. Es ist dementsprechend denkbar, dass die Stärkekomponten ebenfalls als eine Art strukturelles Templat für die Aggregation von GnRH-Antagonisten fungieren könnten.

Der Übergang vom kationischen Polysaccharid Chitosan zu neutralen Polysacchariden ermöglicht daher zumindest eine Verzögerung in der initialen Freisetzungsphase durch eine Verstärkung der amyloiden Aggregation. Der Anstieg in der zweiten Freisetzungsphase wird jedoch in der Regel für solche Systeme durch die Amyloidstruktur vorgegeben. Um eine noch stärkere Stabilisierung und damit einen noch stärkeren Depoteffekt zu generieren, wäre daher der Übergang zu anionischen Polysacchariden denkbar. Als Modellsbstanzten für dieses Verhalten dienen in der vorliegenden Arbeit Alginat und Hyaluronat.

Die strukturelle Beeinflussung von GnRH-Antagonisten durch anionische Polysaccharide, im Speziellen durch Hyaluronsäure, wurde in der Masterarbeit von P. Körner [Körner, 2015] sowohl mit struktur-sensitiven Sonden als auch mithilfe der ATR-FTIR-Spektroskopie untersucht. Es zeigte sich dabei, dass die amyloide Struktur der GnRH-Antagonisten in Komplexen mit diesen Polysacchariden erhalten bleibt und möglicherweise sogar verstärkt wird.

Die in Abschnitt 4.5.2.3 dargelegten Ergebnisse zum Dialyseliberationsverhalten von Cetrorelix-Komplexen mit Alginat und Hyaluronat bringen deutlich voneinander abweichende Tendenzen zu Tage. Während Alginat die erwartete, stabilisierende Wirkung auf die Peptidfibrillen ausübt und daher bei allen pH-Werten zu einer deutlichen Verzögerung der

Peptidfreisetzung führt, bewirkt Hyaluronsäure bei pH 5,0 und pH 7,0 eine forcierte Freisetzung von Cetrorelix. Der Effekt ist nicht trivial verständlich und lässt sich aufgrund der ATR-FTIR-Ergebnisse von KÖRNER, 2015 definitiv nicht auf eine Störung der β -Faltblatt-Strukturen der amyloiden Aggregate zurückführen. Es ist jedoch denkbar, dass eine andersartige Interaktion zu einer Bildung kleinerer und daher mobiler Oligomere mit grundsätzlich amyloiden Strukturmerkmalen führt. Strukturell besteht zwischen Alginat und Hyaluronat insofern ein bedeutender Unterschied, als dass Hyaluronat alternierend zu den anionischen Monomereinheiten neutrale N-Acetylglukosamineinheiten aufweist (vgl. Abschnitt 1.4.2). Hyaluronat verfügt daher potentiell über leicht hydrophobere Bereiche. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass MURGAS, 1997 bei einem Vergleich zwischen Poly-L-Glutamat und Poly-L-Aspartat zu dem Ergebnis kam, dass das leicht hydrophobere Poly-L-Glutamat einen signifikant stärker ausgeprägten Effekt auf das Freisetzungsverhalten von Cetrorelix hat als die hydrophilere Verbindung, und daraus schlussfolgerte, dass für die Interaktion von Cetrorelix mit diesen Partnermolekülen neben ionischen auch hydrophobe Wechselwirkungen von erheblicher Bedeutung sind.

Sollten Folgeuntersuchungen belegen können, dass Hyaluronat mit Cetrorelix kleine, mobile Komplexe bildet, wäre dies in Hinblick auf die spezifische Rezeptorinteraktion des Polysaccharides mit Tumorzellen durchaus von Bedeutung für den Transport des Wirkstoffes zum Tumorgewebe (vgl. Abschnitt 1.4.2). Die systemische, Hypophysen-vermittelte Wirkung von GnRH-Antagonisten könnte ebenfalls von der erhöhten Mobilisierung profitieren.

5.3.3 Komplexe mit Tanninfraktionen und -spezies

Im Gegensatz zu den im vorhergehenden Abschnitt betrachteten Polysacchariden liegt die Zielrichtung beim Einsatz von Tanninspezies als Partnermoleküle zur Komplexierung von GnRH-Antagonisten nicht vordergründig in der Generierung eines Retardeffektes, sondern vielmehr in der Störung der amyloiden Aggregatstruktur und in dessen Folge in der Überwindung der kinetischen Limitierungen der Freisetzungskinetik durch die korrespondierende Gleichgewichtslage zwischen aggregierten und deaggregierten Peptidanteilen. Aufgrunddessen wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Freisetzungsverhalten mehrerer GnRH-Antagonisten aus Komplexen mit gerade denjenigen Tanninspezies und -fraktionen näher untersucht, die sich auf Basis der durchgeführten Strukturuntersuchungen als besonders effizient in Hinblick auf die Inhibierung der Amyloidbildung der genannten Peptide erweisen (vgl. Abschnitt 5.2.1).

Für die Interpretation des ermittelten Freisetungsverhaltens der GnRH-Antagonisten aus solchen Komplexen ist es notwendig, das pH-abhängige Verhalten der Peptide ohne Partnermolekül zu berücksichtigen. Betrachtet man zunächst das Verhalten bei pH 3,0, so muss dementsprechend beachtet werden, dass der GnRH-Antagonist selbst unter diesen Bedingungen kein signifikantes Aggregationspotential aufweist und sich daher in der Dialyseliberationsapparatur als freibewegliches Objekt verhält (vgl. Abschnitt 5.3.1). In allen Komplexen mit Tanninspezies oder -fraktionen tritt unter diesen pH-Bedingungen jedoch eine signifikante Verzögerung der Peptidfreisetzung zu Tage, die systematisch mit zunehmendem Massenanteil an Tannin im Komplex zunimmt. Es lässt sich daher eindeutig schlussfolgern, dass die Interaktion zwischen Tannin und Peptid bereits mit der monomeren Spezies des GnRH-Antagonisten auftritt. Diese Erkenntnis korreliert mit der in Abschnitt 5.2.1 diskutierten Beobachtung, dass die anti-amyloide Wirkung der Tannine insbesondere dann wirksam wird, wenn eine Interaktionsphase zwischen Peptid und Tannin bei pH 3,0 vor einer Neutralisierung besteht.

Die Kurvenverläufe der Peptidfreisetzung bei pH 3,0 aus den genannten Komplexen zeigen dabei in keinem Fall die auf die Gleichgewichtseinstellung der Aggregate zurückzuführende lineare Profil, welches für Komplexe mit Polysacchariden bzw. für die reinen Peptid-Referenzen bei höheren pH-Werten charakteristisch ist (vgl. Abschnitte 5.3.1 & 5.3.2). Es ist daher anzunehmen, dass der Retardeffekt im vorliegenden Fall nicht auf dem Verhalten der amyloiden Fibrillen, sondern tatsächlich auf einer Komplexformierung zwischen Tannin und Peptid beruht.

Der Retardeffekt bei pH 3,0 ist bei Verwendung der finalen Tanninspezies 3GG, 4GG bzw. PGG als Komplexpartner für Teverelix sehr viel stärker ausgeprägt als für Cetrorelix und Ozarelix und zeigt eine für die beiden anderen GnRH-Antagonisten nicht zu erkennende systematische, spezifische Zunahme mit steigendem Galloylierungsgrad der Tanninspezies (vgl. Abschnitt 4.5.3.2). Dieser Effekt, der sich auch in den Resultaten bei pH 5,0 herauskristallisiert, legt nahe, dass es eine spezifische Interaktion zwischen Teverelix und diesen depsidfreien Tanninspezies gibt, die für Cetrorelix und Ozarelix in der Form nicht zustande kommt oder für letztgenannte Peptide zumindest deutlich instabiler ist. Der einzige markante strukturelle Unterschied zwischen den Peptiden besteht dabei in der Aminosäure in Position 8 der jeweiligen Sequenz. Während Cetrorelix und Ozarelix an dieser Stelle einen Arginyl-Rest aufweisen, ist dieser Rest im Falle von Teverelix durch eine Isopropyl-Lysyl-Rest substituiert. Inwieweit diese strukturelle Diskrepanz mit der Interaktion zwischen den

Tanninspezies und den GnRH-Antagonisten in Zusammenhang steht, ist jedoch ohne weitere Analysen nicht trivial zu erklären.

Bei pH 5,0 und pH 7,0 wird das Freisetzungsverhalten der Partnermolekül-freien GnRH-Antagonisten durch deren amyloide Aggregation vorgegeben und tritt daher per se verzögert auf. In Komplexformulierungen mit den depsidfreien Tanninspezies 3GG, 4GG und PGG kann das korrespondierende Freisetzungsverhalten der GnRH-Antagonisten über den Untersuchungszeitraum von 28 Tagen kaum beeinflusst werden (vgl. Abschnitt 4.5.3.2). Lediglich im Fall von Teverelix kann bei pH 5,0 noch eine signifikante Verzögerung der Freisetzung des Peptides (vgl. Abb. 204) und korrespondierend auch der Tanninspezies (vgl. Abb. 206) beobachtet werden, was nochmals auf die besondere Stabilität gerade dieser Komplexe hinweist. In allen anderen Fällen wird für die Komplexe das gleiche Freisetzungsverhalten wie für die korrespondierenden Peptid-Referenzen detektiert, sodass in diesen Fällen stark davon auszugehen ist, dass das Peptid amyloid aggregiert vorliegt, was zum Abschluss des Experimentes IR-spektroskopisch stichprobenartig bestätigt werden konnte (nicht dargestellt).

Die Kongorotbindungsuntersuchungen aus Abschnitt 4.4.3.6 lassen indes keinen Zweifel daran, dass die Peptid-Komplexe mit diesen Tanninspezies zu Beginn des Liberationsversuches keine wesentlichen amyloiden Anteile enthalten können. Es ist daher zu konstatieren, dass die amyloide Aggregation im Verlauf der Versuchsdurchführung erst eingetreten sein muss, was auf einen Verlust der anti-amyloiden Wirkung der Tanninspezies hindeutet. Die in Abschnitt 4.5.3.2 aufgeführten HPLC-Chromatogramme zur Analyse der zeitabhängig freigesetzten Tanninspezies zeigt diesbezüglich, dass es einerseits zu einem raschen Verlust der Tanninspezies aus den Komplexen kommt, wodurch bereits nach 7 Tagen der Gleichverteilungszustand annähernd erreicht wird, und andererseits treten mit zunehmendem pH-Wert schrittweise Degradationserscheinungen auf. Beide Prozesse führen zu einer deutlichen Verringerung der anti-amyloiden Wirkung der Spezies im Bereich des inneren Gefäßes und erlauben daher eine Reaggregation des Peptides.

Ein abweichendes Verhalten bei diesen pH-Bedingungen wird hingegen in den Komplexen mit der ungetrennten Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* und den Teilfraktionen der stark galloylierten Tanninfraktion TaF3 ermittelt (vgl. Abschnitte 4.5.3.1 & 4.5.4.1). In beiden Fällen wird bei pH 7,0 eine verstärkte Freisetzung von GnRH-Antagonisten über den Versuchsablauf erkannt, was auf einen zumindest teilweisen Erhalt der anti-amyloiden Wirkung hinweist. Bei näherer Betrachtung der zeitabhängig freigesetzten Tanninspezies fällt dabei auf, dass keinesfalls eine rasche Freisetzung der ursprünglich eingesetzten Spezies

erfolgt, sondern nur kleinere Hydrolyse- und Degradationsprodukte detektiert werden (vgl. Abb. 214 & Abb. 217). Des Weiteren wird aus diesen Chromatogrammen auch deutlich, dass am Ende des Versuches einzelne, offensichtlich größere Tanninspezies noch im inneren Liberationsgefäß vorzufinden und daher nicht durch Diffusion verloren gegangen sind.

Diese Resultate suggerieren, dass die Komplexbildung zwischen Tannin und Peptid in einem dynamischen Gleichgewicht mit den freien Spezies vorliegt und daher zum Erhalt der aggregationsinhibierenden Wirkung der Tanninspezies deren diffusiver Verlust aus dem Komplex mit dem GnRH-Antagonisten effizient unterbunden werden muss.

Unter physiologischen Bedingungen ist neben einem annähernd neutralen pH-Wert auch ein Natriumchlorid-Gehalt von 0,9 % zu berücksichtigen, welcher nachweislich die Aggregation von GnRH-Antagonisten drastisch verstärkt [Lang, 1998]. Die Gegenwart von Natriumchlorid steigert daher auch erwartungsgemäß den Aggregat-inhärenten Retardeffekt von GnRH-Antagonisten (vgl. Abb. 193). In Gegenwart der Gallotanninmischung aus *Rhus chinensis* kann dieser Effekt jedoch deutlich verringert werden, sodass in derselben Abbildung eine viel höhere Wirkstofffreisetzung aus solchen Komplexen zu beobachten. Es spricht daher sehr viel dafür, dass ausgewählte Gallotannine auch unter physiologischen Bedingungen eine Erhöhung der Bioverfügbarkeit ermöglichen können.

5.3.4 Komplexe mit kovalenten und nicht-kovalenten Formulierungen aus Chitosan und Tanninspezies

Wie im vorhergehenden Abschnitt erläutert, lässt sich die amyloid-inhibierende Wirkung von Tanninspezies nur dann für eine längerfristige Modifizierung des Freisetzungsverhaltens von GnRH-Antagonisten nutzen, wenn der rasche diffusive Verlust der Tanninspezies aus den entsprechenden Wirkstoffkomplexen verhindert wird. Bei Verwendung unveränderter Tanninkomponenten kann daher der gewünschte, modifizierende Effekt unter annähernd physiologischen pH-Bedingungen nur für Teilfraktionen von TaF3 sowie die ungetrennte Gallotanninmischung nachgewiesen werden, welche jeweils sehr große Tanninspezies enthalten. Der auf Basis der durchgeführten Kongorottitrationen evidente aggregationsinhibierende Effekt der reinen Tanninspezies 3GG, 4GG und PGG lässt sich hingegen in dieser Form nicht zur Modifizierung des Freisetzungsverhaltens ausnutzen.

Um diese Limitierung zu überwinden, wird in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwieweit sich kombinierte Komplexbildungssysteme aus Chitosan und Tanninspezies eignen, um den

diffusiven Verlust der Tanninspezies zu verringern und inwieweit dadurch eine erfolgreiche Mobilisierung des Wirkstoffes unter neutralen pH-Bedingungen erfolgen kann.

Nicht-kovalente Verbindungen zwischen Tanninspezies und Polysacchariden lassen sich leicht herstellen und werden in der Literatur häufiger beschrieben [Mercurio & Smith, 2008; Lataza Rovaletti et al., 2014]. Die auftretenden Interaktionen beruhen auf der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Wie in Abschnitt 4.5.5.1 dargestellt, bewirkt eine solche nicht-kovalente Vernetzung bei pH 3,0 eine deutlich verringerte Freisetzungsgeschwindigkeit von Cetrorelix bei einem annähernd linearen Liberationsprofil. Ein solches Verhalten ist weder für Chitosan (vgl. Abschnitt 4.5.2) noch für die entsprechenden Tanninspezies als Komplexpartner zu beobachten (vgl. Abschnitt 4.5.3.2), sodass definitiv eine signifikante Veränderung des Systems durch Interaktion beider Partnermoleküle miteinander zu konstatieren ist. Bei höheren pH-Werten wird jedoch keine Modifikation des Liberationsverhaltens gegenüber der Peptid-Referenz ersichtlich und gleichzeitig weisen die HPLC-Chromatogramme zur Analyse der zeitabhängigen Freisetzung der Tanninspezies auch auf eine weiterhin rasch erfolgende Diffusion dieser Komplexpartner hin. Eine nicht-kovalente Anbindung ist demzufolge als nicht ausreichend zu bewerten.

Die kovalente Verknüpfung von Tanninspezies mit Chitosan wurde vor der vorliegenden Arbeit nur enzymatisch mithilfe der Laccase aus *Trametes versicolor* versucht [Božič et al., 2012 (2)], wobei eine oxidative Chinonbildung im Bereich einzelner Galloyleinheiten beabsichtigt war, in deren Folge eine spontane Schiff-Base-Reaktion mit den freien Aminogruppen des Chitosans auftreten sollte. Im Ergebnis der genannten Arbeit konnten jedoch nur einzelne Galloylgruppen, nicht jedoch komplette Tanninstrukturen an das Polysaccharid gebunden werden. Als Ursache wurde die unter den Reaktionsbedingungen schnell ablaufende Hydrolyse der Tannine angeführt.

Ausgehend von diesem Ansatz wurde in der Bachelorarbeit von M. Göbel [Göbel, 2014] versucht, die genannte Chinon-Zwischenstufe und die anschließende Verknüpfung dieser Spezies mit der Aminogruppe des Chitosans auf chemisch-synthetischem Wege zu erreichen, was allerdings aufgrund von zahlreichen Problemen im Zuge der Oxidation, insbesondere durch die kaum kontrollierbare Bildung von Nebenprodukten, nicht erfolgreich verlief.

In der Masterarbeit von P. Körner [Körner, 2015] wurde daher eine alternative Strategie entwickelt, bei der zunächst durch Umsetzung von Chitosan mit Bersteinsäureanhydrid N-Succinylchitosan als Zwischenstufe synthetisiert und dieses anschließend mittels Säuregruppenaktivierung durch EDC und HOBt mit Tanninspezies verknüpft wird (vgl. Abschnitt 3.19). KÖRNER, 2015 konnte demonstrieren, dass die dabei generierten Polymere in

der Lage sind, GnRH-Antagonisten zu binden und auch bei neutralen pH-Bedingungen an der Amyloidbildung zu hindern.

Die mit den so generierten, kovalent verbundenen Systemen aus Chitosan und PGG erzeugten Cetorelix-Komplexe zeigen bei pH 3,0 anhand des auftretenden Retard-Effektes eine stabilisierende Interaktion zwischen Peptid und Komplexpartner. Bei pH 5,0 und pH 7,0 wird dagegen eine drastische Steigerung der Wirkstofffreisetzung aus diesen Systemen bewirkt (vgl. Abschnitt 4.5.5.2), sodass hiermit eine Wirkstoffformulierung vorliegt, die eine erhebliche Steigerung der Bioverfügbarkeit unter physiologischen pH-Bedingungen mit sich bringt. Die korrespondierenden HPLC-Chromatogramme der parallel ablaufenden Tanninfreisetzung zeigen lediglich eine allmähliche Freisetzung von Gallussäure, jedoch keine Freisetzung von Galloylglukosen, was untermauert, dass auf diese Weise der diffusive Verlust langfristig vermieden werden kann. Weiterhin ist es angesichts der nicht abschließend geklärten Toxikologie größerer Tanninspezies von Vorteil, dass nur Gallussäure in größeren Mengen von diesem System freigesetzt wird, welche diesbezüglich als unbedenklich gilt (vgl. Abschnitt 1.4.3).

6 Zusammenfassung

Seit der Entwicklung von GnRH-Antagonisten in den 1980er Jahren besteht der Wunsch, deren großes Potential in der Therapie hormonabhängiger Tumore in der Praxis nutzen zu können. Von Anfang an erwies sich allerdings die Neigung dieser synthetischen Peptide zur Aggregation und Gelbildung als wesentliches Hindernis. Da langjährige Versuche, dieses Probleme durch Testung empirischer Zusätze in den Griff zu bekommen, wenig erfolgreich verliefen, bestand ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit darin, durch gezielte Strukturuntersuchungen Erkenntnisse über den molekularen Aufbau und den Bildungsprozess der entstehenden Peptidaggregate zu gewinnen, um deren Bildung gezielt entgegenwirken und damit die Bioverfügbarkeit dieser Wirkstoffe vergrößern zu können.

Um die strukturellen Ursachen der auftretenden Aggregation von GnRH-Antagonisten verstehen zu können, lag ein Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Aufklärung der 3D-Struktur der entsprechenden Peptidmonomere bzw. von Vorstufen dieser Aggregate. Zu diesem Zweck wurden mithilfe von Doppelbrechungs- und Sondenbindungsversuchen Phasendiagramme einzelner GnRH-Antagonisten in diversen, binären Lösungsmittelgemischen aufgestellt und auf deren Basis einerseits Kristallisationsversuche und des Weiteren zweidimensionale NMR-Studien in Lösung ermöglicht.

Der Versuch der Kristallisation lieferte zwar unter geeigneten Bedingungen doppelbrechende Festkörper, was stark für eine Bildung der gewünschten geordneten Festkörper spricht, jedoch konnten diese Festkörper nicht ohne Verlust der doppelbrechenden Eigenschaften aus der hochviskosen Mutterlauge entfernt und zur röntgendiffraktometrischen Untersuchung eingesetzt werden.

Eine Untersuchung der 3D-Struktur der Monomere mittels zweidimensionaler NMR-Spektroskopie verlief hingegen erfolgreich. Unter verschiedenen Lösungsbedingungen wurden auf Basis von NOESY- und ROESY-Spektren dreidimensionale Strukturen mehrerer GnRH-Antagonisten der 3. und 4. Generation berechnet, wobei zum Zweck der Berechnung ein spezielles Softwaresystem etabliert und modifiziert wurde, was im Wesentlichen auf dem Programmpaket "UNIO" von T. Herrmann beruht. Die Modifizierungen waren dabei notwendig, da die verwendeten Programmkomponenten selbst nicht in der Lage waren, die nicht-kanonischen Aminosäuren der GnRH-Antagonisten zu berücksichtigen. Die erhaltenen Monomerstrukturen der Vertreter der 3. Generation von GnRH-Antagonisten, Teverelix und Cetorelix, weisen bei pH-Werten oberhalb von pH 4 stets zwei gestreckte Sequenzabschnitt

auf, die durch den Tyr⁵-Rest voneinander getrennt vorliegen. Anhand von Teverelix-Trifluoracetat konnte zudem gezeigt werden, dass das Peptid unterhalb von pH 3 eine eher helikale Konformation einnimmt.

Für Ozarelix als Vertreter der 4. Generation von GnRH-Antagonisten erbrachte die NMR-spektroskopische Analyse, dass die für diese Generation charakteristische Rückgrat-methylierung an Position 5 zur Bildung eines Isomerengemisches mit einer *cis*- bzw. einer *trans*-konfigurierten Peptidbindung an dieser Stelle im Verhältnis 4 : 1 führt. Während das *trans*-Isomer eine helikale Konformation des Peptides hervorruft, zeigt das *cis*-Isomer eine analoge Konformation zu den Vertretern der 3. Generation aus zwei gestreckten Sequenzabschnitten, welche an Position 5 durch eine Krümmung des Rückgrates voneinander separiert vorliegen.

Durch Bandenformanalyse der IR-spektroskopisch ermittelten Amid I-Bande von Aggregaten verschiedener GnRH-Antagonisten und deren Fragmenten gelang es, die Ausbildung spezieller Sekundärstrukturbereiche während der Aggregation, insbesondere die Formierung ausgedehnter amyloider β -Faltblattstrukturen, in bestimmten Abschnitten des Peptidrückgrates orts aufgelöst zu untersuchen. Daraus resultierte unter anderem die Erkenntnis, dass in der Amyloidstruktur dieser Peptide zwei durch die Aminosäure in Position 5 voneinander getrennte Sequenzabschnitte zwei unterscheidbare intermolekulare β -Faltblattbereiche ausbilden. Da diese Strukturbildung bereits in der NMR-spektroskopisch bestimmten 3D-Struktur mit den korrespondierenden, gestreckten Sequenzabschnitten prädestiniert ist, konnte die Monomerkonformation als ursächlich für das starke Aggregationspotential identifiziert werden.

Unter Nutzung strukturselektiver Sonden sowie statischer und zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie erfolgten Studien zum Aggregationsprozess in Lösung. Dabei wurde im Rahmen dieser Arbeit unter anderem eine spezielle Titrationsmethode unter Nutzung der Amyloid-Sonde Kongorot entwickelt, welche eine exakte Quantifizierung des Amyloidgehaltes von GnRH-Antagonisten ermöglicht. Dieses Verfahren wurde im weiteren Verlauf zur Quantifizierung des aggregations-inhibierenden Effektes diverser Additivmoleküle genutzt. Basierend auf Resultaten der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie konnten für mehrere GnRH-Antagonisten einzelne konzentrationsabhängige Stufen der Aggregation nachgewiesen werden.

Im Zusammenhang mit der parallel in der Arbeitsgruppe entstandenen Dissertation von Dr. A. Schneider [Schneider, 2014], der sich im Wesentlichen unter Nutzung von Methoden der theoretischen Chemie mit der Aggregation von GnRH-Antagonisten befasste, gelang es, eine

detaillierte Struktur der amyloiden Aggregate von GnRH-Antagonisten zu beschreiben und deren Bildungsprozess in wesentlichen Schritten nachzuvollziehen.

In Zusammenarbeit mit Biscayne Pharmaceuticals Inc. und der University of Miami war es möglich, das Aggregationsverhalten eines GHRH-Analogons vergleichend zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieses Peptid ebenfalls amyloid aggregiert, wenn auch schwächer als GnRH-Antagonisten, und dass einige an GnRH-Antagonisten gezeigte Verhaltensweisen auch auf GHRH-Antagonisten übertragbar sind. So konnte etwa ein Zusammenhang zwischen dem pK_s -Wert enthaltener heterozyklischer Aminosäurereste und dem Einsetzen der Amyloidbildung festgestellt werden. Die Aggregation des GHRH-Analogons ist erst oberhalb von pH 6 nachweisbar, was darauf hinweist, dass für die Aggregation dieses Peptides der Aminosäure Histidin eine ähnliche Bedeutung zukommt, wie der Aminosäure Pyridylalanin in GnRH-Antagonisten, welche bereits oberhalb von pH 4 Aggregate ausbilden. Mithilfe von TEM-, umfangreichen NMR-, ATR-FTIR- und Sondenbindungsversuchen wurden zudem strukturelle Unterschiede zwischen unterschiedlichen Chargen des GHRH-Analogons aufgedeckt und einige mögliche aggregationsinhibierende Zusätze getestet. Dabei ließ sich beispielsweise für L-Ascorbinsäure nachweislich die Peptidaggregation für einige Zeit unterbinden, wobei der Effekt jedoch nach wenigen Tagen verloren geht.

Die Generierung von Komplexformulierungen aus den pharmazeutisch relevanten GnRH-Antagonisten und zusätzlichen biophilen Partnermolekülen verfolgte zwei zentrale Zielstellungen: zum einen sollte verhindert werden, dass die Bioverfügbarkeit des Pharmakons durch Amyloidbildung verringert wird und zum anderen sollte eine für die Therapie unerlässliche, gleichmäßige Freisetzung des Medikamentes über einen längeren Zeitraum von einigen Wochen realisiert werden.

Die erste Gruppe der untersuchten Partnermoleküle entstammte dem Bereich der Polysaccharide, da insbesondere durch Chitosan bereits in früheren Arbeiten zumindest eine Freisetungsverzögerung von GnRH-Antagonisten gezeigt werden konnte und die biokompatiblen Eigenschaften vieler Polysaccharide ihren Einsatz in pharmazeutischen Formulierungen erstrebenswert machen. Die Untersuchungen an Komplexen aus Polysacchariden und GnRH-Antagonisten weisen daraufhin, dass in allen Fällen eine Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Peptid und Partnermolekül erfolgt, wobei allerdings die Amyloidbildung des Peptides nicht unterbunden, sondern ganz im Gegenteil partiell forciert wird. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass GnRH-Antagonisten in essigsaurer Lösung bei pH 3 keine Tendenz zur Amyloidbildung aufweisen,

in Gegenwart von Stärkekomponenten jedoch bereits unter diesen Bedingungen Fällungsprodukte bilden, die neben der Interaktion mit dem Polysaccharid eindeutig die Merkmale amyloider Fibrillen zeigen.

Für die Untersuchung des Freisetungsverhaltens wurde eine spezielle Dialyseliberationsapparatur entwickelt, die es im Gegensatz zu den meisten etablierten galenischen Apparaturen erlaubt, ausschließlich die Freisetzung von Peptidanteilen zu verfolgen, die eine 12 kDa-Membran passieren können und damit potentiell klein genug sind, um eine Bioverfügbarkeit zu suggerieren. Bei diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die sämtlich positiv geladenen GnRH-Antagonisten in Gegenwart von ebenfalls positiv geladenen Polysacchariden (Chitosane) ein kaum modifiziertes Verhalten gegenüber den reinen Peptidaggregaten zeigen. Der aus früheren Arbeiten bekannte Depoteffekt von Chitosan besteht lediglich in der Bündelung der Peptidfibrillen zu größeren Objekten, die auch in den etablierten galenischen Apparaturen als "nicht-freigesetzt" erfasst werden können. Die für die Bioverfügbarkeit relevante Freisetzung von Peptid-Monomeren oder kleinen Oligomeren wird indes ausschließlich durch die Stabilität der Amyloidfibrillen selbst limitiert.

Auch in Gegenwart von neutralen Polysacchariden (Stärke, Amylose, Amylopektin) dominiert das Amyloidverhalten die Freisetzung, wobei in diesen Fällen auch eine Verringerung der Freisetzungsgeschwindigkeit ermöglicht wird. Das anionische Polysaccharid Alginat verringert als Komplexbpartner die Peptid-Freisetzung aufgrund der elektrostatischen Komponente zusätzlich. Das ebenfalls anionische Polysaccharid Hyaluronat zeigt trotz evidenter Verstärkung der Amyloidbildung von GnRH-Antagonisten hingegen erstaunlicherweise in Abhängigkeit vom pH-Wert partiell sogar eine verstärkte Freisetzung des Wirkstoffes.

Als zweite Gruppe untersuchter Partnermoleküle wurden potentielle Aggregationsinhibitoren gesucht. Dabei zeigte ein anfängliches Screening möglicher Verbindungen, dass beispielsweise Poly-L-Glutamat, auch in großem Überschuss nur einen bestimmten Anteil der amyloiden Struktur der GnRH-Antagonisten beeinflussen kann. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse zur Struktur der Peptidaggregate scheint es offensichtlich, dass in diesen Fällen lediglich eine Interaktion mit einem der beiden unterscheidbaren β -Faltblattbereiche der Aggregate zustande kommt und der zweite unbeeinflusst bleibt. Aufgrund elektrostatischer Gesichtspunkte wurde der von Poly-L-Glutamat beeinflusste Bereich als der C-terminal von Position 5 gelegene Sequenzabschnitt identifiziert.

Es zeigte sich jedoch, dass eine Gallotannin-Mischung aus *Rhus chinensis* in der Lage ist, die Amyloidbildung des Peptides vollständig zu unterbinden. Um diese aus hunderten strukturell

ähnlichen Verbindungen bestehende Naturstoffmischung näher auf ihre aktiven Komponenten hin analysieren zu können, wurden umfangreiche Versuche zur Trennung und Charakterisierung der Tanninmischung unternommen. Es wurde einerseits eine mehrstufige chromatographische Trennung über eine Sephadex LH-20-Säule und eine anschließende präparative HPLC an einer RP-8-Säule etabliert, wodurch mehrere Teilfraktionen gewonnen werden konnten. Andererseits konnten in einem alternativen Verfahren über selektive Methanolyse, mehrere Extraktions- und Fällungsschritte, sowie abschließender präparativer HPLC drei Gallotannine als Reinstoff gewonnen werden, welche jedoch aufgrund des Methanolyseschlusses keine Depsidbindungen zwischen phenolischen OH-Gruppen und den Säuregruppen von Gallussäureeinheiten enthalten, die sich teilweise als effizienzsteigernd bezüglich der anti-amyloiden Wirkung erwiesen haben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgten umfangreiche Charakterisierungen zu Zusammensetzung und Struktur der einzelnen Tanninfraktionen und -spezies, sowie zu ihrer amyloid-inhibierenden Wirkung. Die meisten der generierten Gallotannin-Fraktionen üben diesbezüglich einen stark deaggregierenden Effekt auf GnRH-Antagonisten aus, wobei es signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Verbindungen gibt. So ist der Effekt von Galloylglukosen mit mindestens 5 Gallussäureeinheiten deutlich größer als der von Galloylglukosen mit 4 oder weniger derartigen Einheiten. Weiterhin steigern Depsidbindungen partiell die erzielte Wirkung.

Die Freisetzungsexperimente von verschiedenen GnRH-Antagonisten in Gegenwart von Tanninfraktionen ergaben, dass sich teilweise sogar unter physiologischen pH- und NaCl-Bedingungen GnRH-Antagonisten mobilisieren lassen, was bisher mit keinem System gelungen ist. Allerdings zeigte sich auch, dass insbesondere kleinere Gallotannine die Formulierung rasch durch Diffusion verlassen und anschließend die amyloide Aggregation des Wirkstoffes wieder einsetzt. Der Versuch, den Diffusionsverlust durch nicht-kovalente Mischungen von Gallotanninen mit Chitosan zu reduzieren, zeitigte nur geringen Erfolg. Daher wurden Anstrengungen unternommen, Gallotannine kovalent an Chitosan zu binden, was schlussendlich durch Umsetzung der Aminogruppe des Chitosans mit Bernsteinsäureanhydrid gefolgt von einer Aktivierung der Säuregruppe mit HOBt und EDC und anschließender Reaktion mit der Phenolgruppe des Gallotannins auch gelang. Die kovalenten Chitosan-Tannin-Verbindungen ermöglichen die beabsichtigte Freisetzung der GnRH-Antagonisten unter physiologischen pH-Bedingungen über einen langen Zeitraum.

Es steht damit ein System zur Verfügung, welches einerseits die Amyloidbildung des Wirkstoffes effektiv verhindert und gleichsam eine kontrolliert verzögerte Freisetzung ermöglicht, wie sie für den pharmazeutischen Einsatz erforderlich ist.

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

[SwissSideChain, 2015] http://www.swissidechain.ch/include/view_sidechain.php?code=PYP3

- AGUZZI, A. & CALELLA, A.M.: Prions: protein aggregation and infectious diseases, *Physiol. Rev.*, **2009**, 89, 1105-1152
- ALBANO, C., Felberbaum, R. E., Smitz, J., Riethmuller-Winzen, H., Engel, J., Diedrich, K. & Devroey, P.: Ovarian stimulation with HMG: results of a prospective randomized phase III European study comparing the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-antagonist cetrorelix and the LHRH-agonist buserelin. European Cetrorelix Study Group, *Hum Reprod*, **2000**, 15, 526-531
- ALVES, N.M. & MANO, J.F.: Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2008**, 43(5), 401-414
- AMINABHAVI, T. M., Agnihotri, S. A. & Mallikarjuna, N. N.: Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery, *Journal of Controlled Release*, **2004**, 100, 5-28
- ANET, F.A.L. & BOURN, A.J.R.: Nuclear magnetic resonance spectral assignments from nuclear Overhauser effects, *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, 87(22), 5250-5251
- ANTALEK, B.: Using pulsed gradient spin echo nmr for chemical mixture analysis: how to obtain optimum results, *Concept Magnetic Res.*, **2002**, 14, 225-228
- ARAPITSAS, P., Menichetti, S., Vincieri, F.F. & Romani, A.: Hydrolyzable tannins with the hexahydroxydiphenoyl unit and the m-depsidic link: HPLC/DAD-MS identification and model synthesis, *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55(1), 48-55
- ARRICH, J., Piribauer, F., Mad, P., Schmid, D., Klaushofer, K. & Müllner, M.: Intra-articular hyaluronic acid for the treatment of osteoarthritis of the knee: systematic review and meta-analysis, *CMAJ*, **2005**, 172(8), 1-12
- ASCENZI, P., Bocedi, A., Bolognesi, M., Spallarossa, A., Coletta, M., De Cristofaro, R. & Menegatti, E.: The bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor): a milestone protein., *Curr. Protein Peptide Sci.*, **2003**, 4, 231-251
- AUE, W.P., Bartholdi, E. & Ernst, R.R.: Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance, *J. Chem. Phys.*, **1976**, 64(5), 2229-2246
- BAJUSZ, S., Csernus, V. J., Janaky, T., Bokser, L., Fekete, M. & Schally, A. V.: New antagonists of LHRH. II. Inhibition and potentiation of LHRH by closely related analogues, *Int J Pept Protein Res*, **1988**, 32, 425-435
- BAKER, D. & AGARD, D.A.: Kinetics versus thermodynamics in protein folding, *Biochemistry*, **1994**, 33, 7505-7509
- BALAZS, E.A., Watson, D., Duff, I.F. & Roseman, S.: Hyaluronic acid in synovial fluid. I. Molecular parameters of hyaluronic acid in normal and arthritic human fluids, *Arthritis & Rheumatism*, **1967**, 10(4), 357-376
- BANEY, R., Lee, D.-W. & Powers, K.: Physicochemical properties and blood compatibility of acylated chitosan nanoparticles, *Carbohydrate Polymers*, **2004**, 58, 371-377

- BARTELS, T., Choi, J.G. & Selkoe, D.J.: α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation, *Nature*, **2011**, 477, 107-110
- BAX, A. & DAVIS, D.G.: MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy, *J. Magn. Reson.*, **1985** (1), 65, 355-360
- BAX, A. & DAVIS, D.G.: Practical aspects of two-dimensional transverse NOE spectroscopy, *J. Magn. Reson.*, **1985** (2), 63, 207-213
- BAX, A. & SUMMERS, M.F.: ^1H and ^{13}C assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum nmr, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 2093-2094
- BAX, A., Davis, D. G., Sarkar, S.K.: An improved method for two-dimensional heteronuclear relayed-coherence-transfer nmr spectroscopy, *J. Magn. Reson.*, **1985**, 63, 230-234
- BAX, A., Sklenár, V. & Summers, M.F.: Direct identification of relayed nuclear Overhauser effects, *J. Magn. Reson.*, **1986**, 70, 327-331
- BAX, A.: Two-dimensional nmr and protein structure, *Annu. Rev. Biochem.*, **1989**, 58, 223-256
- BEIL, S., Schamberger, A., Naumann, W., Machill, S. & van Pée, K.-H.: Determination of the degree of N-acetylation (DA) of chitin and chitosan in the presence of water by first derivative ATR FTIR spectroscopy, *Carbohydrate Polymers*, **2012**(2), 87(1), 117-122
- BEIL, S.: Spektroskopische Charakterisierung von Chitosan-Peptid-Komplexen, **2012**(1), *Masterarbeit, TU Dresden*
- BEIL, S.: Untersuchungen zur Eignung der Diamant-ATR-FTIR-Spektroskopie zur Bestimmung des N-Acetylierungsgrades niedermolekularer Chitosanfraktionen, **2009**, *Bachelorarbeit, TU Dresden*
- BELLYEI, S., Schally, A.V., Zarandi, M., Varga, J.L., Vidaurre, I. & Pozsgai, E.: GHRH antagonists reduce the invasive and metastatic potential of human cancer cell lines in vitro, *Cancer Letters*, **2010**, 293, 31-40
- BENNHOLD, H.: Eine spezifische Amyloidfärbung mit Kongorot, *Münch. Med. Wochenschr.*, **1922**, 69, 1537-1538
- BERGMANN, J.: Chromatographische Trennung und Charakterisierung von Tannin-Fractionen zur Komplexierung von GnRH-Antagonisten, **2013**, *Bachelorarbeit, TU Dresden*
- BIESCHKE, J., Russ, J., Friedrich, R.P., Ehrnhöfer, D.E., Wobst, H., Neugebauer, K. & Wanker, E.E.: EGCG remodels mature α -synuclein and amyloid-beta fibrils and reduces cellular toxicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, 107(17), 7710-7715
- BILLETER, M., Braun, W. & Wüthrich, K.: Sequential resonance assignments in protein ^1H nuclear magnetic resonance spectra: Computation of sterically allowed proton-proton distances and statistical analysis of proton-proton distances in single crystal protein conformations, *J. Mol. Biol.*, **1982**, 155, 321-346
- BLUMENTHAL, L.M.: Theory and applications of distance geometry, **1970**, 2. Auflage, *Chelsea House Pub. Co.*
- BODENHAUSEN, G. & RUBEN, D.J.: Natural abundance nitrogen-15 nmr by enhanced heteronuclear spectroscopy, *Chemical Physics Letters*, **1980**, 69(1), 185-189

- BONAR, L., Cohen, A.S. & Skinner, M.: Characterization of the amyloid fibril as a cross- β protein, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1969**, 131, 1373-1375
- BOONTHEEKUL, T., Kong, H.J. & Mooney, D.J.: Controlling alginate gel degradation utilizing partial oxidation and bimodal molecular weight distribution, *Biomaterials*, **2005**, 26(15), 2455-2465
- BOTHNER-BY, A.A. & COX, R.H.: Estimation of vicinal phosphorus-31-hydrogen and nitrogen-14-hydrogen spin-spin coupling constants in single conformers, *J. Phys. Chem.*, **1969**, 73(6), 1830-1834
- BOTHNER-BY, A.A., Stephens, R.L., Lee, J., Warren, C.D. & Jeanloz, R.W.: Structure determination of a tetrasaccharide: transient nuclear Overhauser effects in the rotating frame, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 811-813
- BOTHNER-BY, A.A.: Geminal and vicinal proton-proton coupling constants in organic compounds, *Adv. Magn. Reson.*, **1965**, 1, 195-316
- BOYÉ-HARNASCH, M. & CULLIN, C.: A novel in vitro filter trap assay identifies tannic acid as an amyloid aggregation inducer for HET-s, *Journal of Biotechnology*, **2006**, 125, 222-230
- BOŽIČ, M., Gorgieva, S. & Kokol, V.: Homogeneous and heterogeneous methods for laccase-mediated functionalization of chitosan by tannic acid and quercetin, *Carbohydrate Polymers*, **2012** (2), 89, 854-864
- BOŽIČ, M., Gorgieva, S. & Kokol, V.: Laccase-mediated functionalization of chitosan by caffeic and gallic acids for modulating antioxidant and antimicrobial properties, *Carbohydrate Polymers*, **2012** (1), 87, 2388-2398
- BRAUN, W. & GO, N.: Calculation of protein conformations by proton-proton distance constraints: a new efficient algorithm, *J. Mol. Biol.*, **1985**, 186, 611-626
- BRAUNSCHWEILER, L. & ERNST, R.R.: Coherence transfer by isotropic mixing: application to proton correlation spectroscopy, *J. Magn. Reson.*, **1983**, 53, 521-528
- BRAZEAU, P., Ling, N., Böhlen, P., Esch, F., Ying, S.Y. & Guillemin, R.: Growth hormone releasing factor, somatocrinin, releases pituitary growth hormone in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1982**, 79(24), 7909-7913
- BROOKS, B.R., Bruccoleri, R.E., Olafson, B.D., States, D.J., Swaminathan, S. & Karplus, M.: CHARMM - a program for macromolecular energy minimization, and dynamics calculations, *J. Comput. Chem.*, **1983**, 4, 187-217
- BULAWA, C.E., Connelly, S., DeVit, M., Wang, L., Weigel, C., Fleming, J., Packman, J., Powers, E.T., Wiseman, R.L., Foss, T.R., Wilson, I.A., Kelly, J.W. & Labaudiniere, R.: Tafamidis, a potent and selective transthyretin kinetic stabilizer that inhibits the amyloid cascade, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2012**, 109(24), 9629-9634
- BULIC, B., Pickhardt, M., Schmidt, B., Mandelkow, E.M., Waldmann, H. & Mandelkow, E.: Development of tau aggregation inhibitors for Alzheimer's disease, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **2009**, 48, 1740-1752
- BUSTO, R., Schally, A.V., Braczkowski, R., Plonowski, A., Krupa, M., Groot, K., Armatis, P. & Varga, J.L.: Expression of mRNA for growth hormone-releasing hormone and splice variants of GHRH receptors in human malignant bone tumors, *Regulatory Peptides*, **2002**, 108, 47-53

- BUZZINI, P., Arapitsas, P., Goretti, M., Branda, E., Turchetti, B., Pinelli, P., Ieri, F. & Romani, A.: Antimicrobial and antiviral activity of hydrolysable tannins, *Mini Rev. Med. Chem.*, **2008**, 8(12), 1179-1187
- CAI, R., Schally, A.V., Cui, T., Szalontay, L., Halmos, G., Sha, W., Kovacs, M., Jaszberenyi, M., He, J., Rick, F.G., Popovics, P., Kanashiro-Takeuchi, R., Hare, J.M., Block, N.L. & Zarandi, M.: Synthesis of new potent agonistic analogs of growth hormone-releasing hormone (GHRH) and evaluation of their endocrine and cardiac activities, *Peptides*, **2014**, 52, 104-112
- CAI, Y., Luo, Q., Sun, M. & Corke, H.: Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional chinese medicinal plants associated with anticancer, *Life Sciences*, **2004**, 74(17), 2157-2184
- CAMMANN, J., Denzel, K., Schilling, G. & Gross, G.G.: Biosynthesis of gallotannins: β -glucogallin-dependent formation of 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose by enzymatic galloylation of 1,2,3,6-tetragalloylglucose, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1989**, 73, 58-63
- CASTELLANI, R.J., Perry, G. & Smith, M.A.: The role of novel chitin-like polysaccharides in Alzheimer disease, *Neurotox. Res.*, **2007**, 12(4), 269-274
- CASTELLANI, R.J., Siedlak, S.L., Fortino, A.E., Perry, G., Ghetti, B. & Smith, M.A.: Chitin-like polysaccharides in Alzheimer's disease brains, *Curr. Alzheimer Res.*, **2005**, 2(4), 419-423
- CATANZANO, O., D'Esposito, V., Acierno, S., Ambrosio, M.R., De Caro, C., Avagliano, C., Russo, P., Russo, R., Miro, A., Ungaro, F., Calignano, A., Formisano, P. & Quaglia, F.: Alginate-hyaluronan composite hydrogels accelerate wound healing process, *Carbohydrate Polymers*, **2015**, 131, 407-414
- CHEN, L. & TIANQING, L.: Interaction behaviors between chitosan and hemoglobin, *International Journal of Biological Macromolecules*, **2008**, 42(5), 441-446
- CHEN, X. G., Wang, Q. Z., Liu, N., Wang, S. X., Liu, C. S., Meng, X. H. & Liu, C. G.: Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation, *Carbohydrate Polymers*, **2006**, 65, 194-201
- CHEN, Y. & HAGERMAN, A.E.: Characterization of soluble non-covalent complexes between bovine serum albumin and beta-1,2,3,4,6-penta-o-galloyl-D-glucopyranose by MALDI-TOF MS, *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52(12), 4008-4011
- CHOI, K.Y., Saravanakumar, G., Park, J.H. & Park, K.: Hyaluronic acid-based nanocarriers for intracellular targeting: interfacial interactions with proteins in cancer, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2012**, 99, 82-94
- CHUNG, K.T., Wong, T.Y., Wei, C.I., Huang, Y.W. & Lin, Y.: Tannins and human health: a review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **1998**, 38(6), 421-464
- CLORE, G.M., Gronenborn, A.M., Brunger, A.T. & Karplus, M.: The solution conformation of a heptadecapeptide comprising the DNA binding helix F of the cyclic AMP receptor protein of *Escherichia coli*: combined use of ^1H -nuclear magnetic resonance and restrained molecular dynamics, *J. Mol. Biol.*, **1985**, 186, 435-455
- CLORE, G.M., Martin, S.R. & Gronenborn, A.M.: Solution structure of human growth hormone releasing factor. Combined use of circular dichroism and nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Mol. Biol.*, **1986**, 191(3), 553-561

- COHEN, A.S. & CALKINS, E.: Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins, *Nature*, **1959**, *183*, 1202-1203
- COXON, B.: Conformational analysis via nuclear magnetic resonance spectroscopy., *Methods Carbohydr. Chem.*, **1972**, *6*, 513-539
- COXON, B.: Developments in the Karplus equation as they relate to the nmr coupling constants of carbohydrates, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **2009**, *62*, 17-82
- DAS, K., Sarkar, N., Nath, D. & Bhattacharyya, K.: Non-radiative pathways of aniline-naphthalene sulphonates: twisted intramolecular charge transfer versus intersystem crossing, *Spectrochim. Acta*, **1992**, *48A*, 1701-1705
- DE VOS, P., Faas, M.M., Strand, B. & Calafiore, R.: Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets, *Biomaterials*, **2006**, *27*(32), 5603-5617
- DEBRUYNE, F., Gres, A. A. & Arustamov, D. L.: Placebo-controlled dose-ranging phase 2 study of subcutaneously administered LHRH antagonist cetrorelix in patients with symptomatic benign prostatic hyperplasia, *European Urology*, **2008**, *54*, 170-180
- DELAGLIO, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J. & Bax, A.: NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes, *J. Biomol. NMR*, **1995**, *6*, 277-293
- DELPECH, B., Chevallier, B., Reinhardt, N., Julien, J.-P., Duval, C., Maingonnat, C., Bastit, P. & Asselain, B.: Serum hyaluronan (hyaluronic acid) in breast cancer patients, *Int. J. Cancer*, **1990**, *46*(3), 388-390
- DENES, B., Bantchev, A.V., Karanikolov, S.S., Nikolovski, M., Pantchev, P., Petkova, L.D. & Debruyne, F.: The efficacy, duration of efficacy and safety of Ozarelix, a novel GnRH antagonist, in men with lower urinary tract symptoms (LUTS) due to benign prostatic hyperplasia (BHP), *Urology*, **2007**, *70* (Supplement 3A), MP-20.02
- DENZEL, K. & GROSS, G.G.: Biosynthesis of gallotannins. Enzymatic "disproportionation" of 1,6-digalloylglucose to 1,2,6-trigalloylglucose and 6-galloylglucose by an acyltransferase from leaves of *Rhus typhina* L., *Planta*, **1991**, *184*, 285-289
- DIEDRICH, K., Ludwig, M. & Felberbaum, R. E.: The role of gonadotropin-releasing hormone antagonists in vitro fertilization, *Semin Reprod Med*, **2001**, *19*, 213-220
- DIVRY, P. & FLORKIN, M.: Sur les propriétés optiques de l'amyloïde, *CR Soc. Biol. (Paris)*, **1927**, *97*, 1808-1810
- DOMARD, A.: Determination of N-acetyl content in chitosan samples by c.d. measurements, *International Journal of Biological Macromolecules*, **1987**, *9*, 333-336
- DONG, A., Huang, P. & Caughey, W.S.: Protein secondary structure in water from second-derivative amide I infrared spectra, *Biochemistry*, **1990**, *29*, 3303-3308
- EHRNHÖFER, D.E., Bieschke, J., Böddrich, A., Herbst, M., Masino, L., Lurz, R., Engemann, S., Pastore, A. & Wanker, E.E.: EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2008**, *15*(6), 558-566
- EHRNHÖFER, D.E., Dünnwald, M., Markovic, P., Wacker, J.L., Engemann, S., Roark, M., Legleiter, J., Marsh, J.L., Thompson, L.M., Lindquist, S., Muchowski, P.J. & Wanker, E.E.: Green tea (-)-

- epigallocatechin-gallate modulates early events in huntingtin misfolding and reduces toxicity in Huntington's disease models, *Hum. Mol. Genet.*, **2006**, *15*(18), 2743-2751
- EICHLER, S.: Kalorimetrische und fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen des Aggregationsverhaltens von Peptidhormonen, *TU Dresden*, **2007**, *Diplomarbeit*
- ENGEL, J.B., Rieger, L., Dietl, J. & Hönig, A.: The GnRH antagonist Cetrorelix: established indication and future potential, *Fut. Drugs Exp. Rev. Obst. Gyn.*, **2007**, *2*, 431-440
- ERNST, R.R., Bodenhausen, G. & Wokaun, A.: Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions, **1987**, *Clarendon*, Oxford
- FAHRENFORT, J.: Attenuated total reflection: a new principle for the production of useful infra-red reflection spectra of organic compounds, *Spectrochimica Acta*, **1961**, *17*, 698-709
- FELBERBAUM, R. E. & KARCK, U.: GnRH-Analoga in der Gynäkologie: Agonisten und Antagonisten, *Geburtsh Frauenheilk*, **1997**, *57*, 539-544
- FELBERBAUM, R. E., Germer, U., Ludwig, M., Riethmüller-Winzen, H., Heise, S., Buttge, I., Bauer, O., Reissmann, T., Engel, J. & Diedrich, K.: Treatment of uterine fibroids with a slow-release formulation of the gonadotrophin releasing hormone antagonist Cetrorelix, *Hum Reprod*, **1998**, *13*, 1660-1668
- FERNALD, R.D. & WHITE, R.B.: Gonadotropin-releasing-hormone genes: phylogeny, structure and functions, *Front. Neuroendocrin.*, **1999**, *20*, 224-240
- FISCHER, E.: Synthesis of depsides, lichen-substances and tannins, *J. Am. Chem. Soc.*, **1914**, *36*(6), 1170-1201
- FLUKER, M. R.: Gonadotropin-releasing hormone antagonists, *Curr Opin Endocrinol Diabet*, **2000**, *7*, 350-356
- FREUDENBERG, K.: Die Chemie der natürlichen Gerbstoffe, **1920**, *Springer*, Berlin
- FRIEBOLIN, H.: Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie, **2013**, *5. Auflage*, *Wiley-VCH*, Weinheim
- FRIEDREICH, N. & KEKULÉ, A.: Zur Amyloidfrage, *Virchows Arch. Pathol. Anat.*, **1859**, *16*, 50-65
- FROHMAN, L.A., Downs, T.R., Williams, T.C., Heimer, E.P., Pan, Y.C. & Felix, A.M.: Rapid enzymatic degradation of growth hormone-releasing hormone by plasma in vitro and in vivo to a biologically inactive product cleaved at the NH₂ terminus, *J. Clin. Invest.*, **1986**, *78*(4), 906-913
- FROMME, B., Katz, A., Roeske, R., Millar, R. & Flanagan, A.: Role of Aspartate 7.32(302) of the Human Hormone Receptor in Stabilizing a High-Affinity Ligand Conformation, *Mol Pharmacol*, **2001**, *60*, 1280-1287
- GAJDUSEK, D.C.: Spontaneous generation of infectious nucleating amyloids in the transmissible and nontransmissible cerebral amyloidoses, *Mol. Neurobiol.*, **1994**, *8*, 1-13
- GALLA, H. J. & MÜLLER, H. J.: Spektroskopische Methoden in der Biochemie, *Georg-Thieme-Verlag*, **1988**

- GAYLINN, B.D., Harrison, J.K., Zysk, J.R., Lyons, C.E., Lynch, K.R. & Thorner, M.O.: Molecular cloning and expression of a human anterior pituitary receptor for growth hormone-releasing hormone, *Mol. Endocrinol.*, **1993**, 7(1), 77-84
- GAYLINN, B.D.: Molecular and cell biology of the growth hormone-releasing hormone receptor, *Growth Horm. IGF Res.*, **1999**, 9 (Suppl. A), 37-44
- GFELLER, D., Michielin, O. & Zoete, V.: Expanding molecular modeling and design tools to non-natural sidechains, *J. Comput. Chem.*, **2012**, 33(18), 1525-35
- GFELLER, D., Michielin, O. & Zoete, V.: SwissSidechain: a molecular and structural database of non-natural sidechains, *Nucleic Acids Res.*, **2013**, 41(Database issue), D327-D332
- GILCHRIST, T. & MARTIN, A.M.: Wound treatment with Sorbsan - an alginate fibre dressing, *Biomaterials*, **1983**, 4, 317-320
- GIUFFRIDA, M.L., Caraci, F., Pignataro, B., Cataldo, S., De Bona, P., Bruno, V., Molinaro, G., Pappalardo, G., Messina, A., Palmigiano, A., Garozzo, D., Nicoletti, F., Rizzarelli, E. & Copani, A.: Beta-amyloid monomers are neuroprotective, *J. Neurosci.*, **2009**, 29(34), 10582-10587
- GÖBEL, M.: Herstellung und Charakterisierung von mit Tannin modifiziertem Chitosan zur Komplexierung von GnRH-Antagonisten, *Bachelorarbeit*, **2014**, TU Dresden
- GOERRES, U., Bernd, M. & Reissmann, T.: Pharmacologic characteristics of D-63153, a new potent GnRH antagonist, *Eur. J. Cancer*, **2002**, 38 (Supplement 7), 32
- GRANT, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C. & Thom, D.: Biological interactions between polysaccharides and divalent cations - egg-box model, *FEBS Lett.*, **1973**, 32, 195-198
- GRÖNWALL, C., Jonsson, A., Lindström, S., Gunneriusson, E., Ståhl, S. & Herne, N.: Selection and characterization of Affibody ligands binding to Alzheimer amyloid β peptides, *J. Biotechnol.*, **2007**, 128, 162-183
- GROSS, G.G.: Partial purification and properties of UDP-glucose: vanillate 1-O-glucosyl transferase from oak leaves, *Phytochemistry*, **1983** (1), 22, 2179-2182
- GROSS, G.G.: Synthesis of mono-, di- and trigalloyl- β -D-glucose by β -glucogallin-dependent galloyltransferases from oak leaves, *Zeitschrift für Naturforschung*, **1983** (2), 38(c), 519-523
- GRUNDHÖFER, P., Niemetz, R., Schilling, G. & Gross, G.G.: Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins, *Phytochemistry*, **2001**, 57, 915-927
- GRUNDMANN, C.: Semi-präparative Trennung von Tannin-Fractionen und Untersuchung zu deren Wechselwirkungen mit dem GnRH-Antagonisten Cetrorelix, **2014**, *Bachelorarbeit*, TU Dresden
- GUILLEMIN, R., Brazeau, P., Böhlen, P., Esch, F., Ling, N. & Wehrenberg, W.B.: Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly, *Science*, **1982**, 218(4572), 585-587
- GÜLÇİN, I., Huyut, Z., Elmastaş, M. & Aboul-Enein, H.Y.: Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid, *Arabian Journal of Chemistry*, **2010**, 3(1), 43-53
- GUO, P.: Gallic acid-grafted chitosan films as antioxidant food packaging, **2015**, *Master thesis*, University of Tennessee - Knoxville

- HAGERMAN, A.E. & BUTLER, L.G.: Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins, *J. Agric. Food Chem.*, **1978**, 26(4), 809-812
- HAHN, D. W., McGuire, J. L., Vale, W. W. & Rivier, J.: Reproductive/endocrine and anaphylactoid properties of an LHRH-antagonist, ORF 18260 [Ac-DNAL1(2), 4FDPhe2, D-Trp3, D-Arg6]-GnRH, *Life Sci*, **1985**, 37, 505-514
- HALMOS, G., Schally, A. V. & Kahan, Z.: Down-regulation and change in subcellular distribution of receptors for luteinizing hormone-releasing hormone in OV-1063 human epithelial ovarian cancers during therapy with LHRH antagonist cetrorelix, *Int J Oncol*, **2000**, 17, 367-373
- HÄRD, T. & LENDEL, C.: Inhibition of amyloid formation, *J. Mol. Biol.*, **2012**, 421, 441-465
- HARPER, J.D. & LANSBURY, P.T. JR.: Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins, *Annu. Rev. Biochem.*, **1997**, 66, 385-407
- HARRICK, N. J.: Surface chemistry from spectral analysis of totally internally reflected radiation, *Journal of Physical Chemistry*, **1960**, 64, 1110-1114
- HARRICK, N. J.: Total internal reflection and its application to surface studies, *Annales of the New York Academy of Sciences*, **1963**, 101, 928
- HARTMANN, S.R. & HAHN, E.L.: Nuclear double resonance in the rotating frame, *Phys. Rev.*, **1962**, 128, 2042-2053
- HARWOOD, J.P., Grewe, C. & Aguilera, G.: Actions of growth hormone-releasing factor and somatostatin on adenylate cyclase and growth hormone release in rat anterior pituitary, *Molecular and Cellular Endocrinology*, **1984**, 37(3), 277-284
- HASLAM, E.: Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action, *Journal of Natural Products*, **1996**, 59, 205-215
- HASLAM, E.: Plant polyphenols. Vegetable tannins revisited., **1989**, Cambridge University Press, Cambridge
- HASLAM, E.: Vegetable tannins - lessons of a phytochemical lifetime, *Phytochemistry*, **2007**, 68(22-24), 2713-2721
- HAWE, A., Sutter, M. & Jiskoot, W.: Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization, *Pharm. Res.*, **2008**, 25(7), 1487-1499
- HEMPELT, D.: Untersuchungen zur Komplexierung von Cetrorelix und weiteren GnRH-Antagonisten mit sich selbst und Partnermolekülen, **2012**, Dissertation, TU Dresden
- HERRMANN, T., Güntert, P. & Wüthrich, K.: Protein nmr structure determination with automated NOE-identification in the NOESY spectra using the new software ATNOS, *J. Biomol. NMR*, **2002** (1), 24, 171-189
- HERRMANN, T., Güntert, P. & Wüthrich, K.: Protein nmr structure determination with automated NOE assignment using the new software CANDID and the torsion angle dynamics algorithm DYANA, *J. Mol. Biol.*, **2002** (2), 319, 209-227
- HORVATH, J. E., Ertl, T., Qin, Y. F., Groot, K. & Schally, A. V.: LHRH and its antagonist cetrorelix inhibit growth of JAR human choriocarcinoma cells in vitro, *Int J Oncol*, **1995**, 6, 969-975

- HÖVELMANN, S., Hoffmann, S.H., Kühne, R., ter Laak, T., Reiländer, H. & Beckers, T.: Impact of aromatic residues within transmembrane helix 6 of the human gonadotropin-releasing hormone receptor upon agonist and antagonist binding, *Biochemistry*, **2002**, 41(4), 1129-1136
- HOWLES, C. M.: The place of gonadotrophin-releasing hormone antagonists in reproductive medicine, *Reprod Biomed Online*, **2002**, 4, 64-71
- HOYER, W., Grönwall, C., Jonsson, A., Ståhl, S. & Härd, T.: Stabilization of a β -hairpin in monomeric Alzheimer's amyloid- β peptide inhibits amyloid formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, 105, 5099-5104
- HUIRE, J.A.F. & LAMBALK, C.B.: Gonadotropin-releasing-hormone-receptor antagonists, *Lancet*, **2001**, 358, 1793-1803
- ITANO, N., Sawai, T., Miyaishi, O. & Kimata, K.: Relationship between hyaluronan production and metastatic potential of mouse mammary carcinoma cells, *Cancer Res.*, **1999**, 59(10), 2499-2504
- JAEGER, L.B., Banks, W.A., Varga, J.L. & Schally, A.V.: Antagonists of growth hormone-releasing hormone cross the blood-brain barrier: a potential applicability to treatment of brain tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, 102, 4610-4615
- JAHN, T.R. & RADFORD, S.E.: The Yin and Yang of protein folding, *FEBS J.*, **2005**, 272(23), 5962-5970
- JANÁT-AMSBURY, M.M., Gupta, K.M., Kablitz, C.D. & Peterson, C.M.: Drug delivery for *in vitro* fertilization: Rational, current strategies and challenges, *Adv. Drug Del. Rev.*, **2009**, 61, 871-882
- JANSSENS, R. M. J., Vermeiden, J. P. W., Lambalk, C. B., Schats, R. & Schoemaker, J.: Gonadotropin-releasing hormone agonist dose-dependency of pituitary desensitization during controlled ovarian hyperstimulation in IVF, *Hum Reprod*, **1998**, 13(9), 2386-2391
- JAYAMANI, J. & SHANMUGAN, G.: Gallic acid, one of the components in many plant tissues, is a potential inhibitor for insulin amyloid fibril formation, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2014**, 85, 352-358
- JEENER, J., **1971**, Ampere International Summer School, Basko Polje, Jugoslawien
- JEENER, J., Meier, B.H., Bachmann, P. & Ernst, R.R.: Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy, *J. Chem. Phys.*, **1979**, 71(11), 4546-4553
- JEUNIAUX, C. & VOSS-FOUCART, M. F.: Chitin biomass and production in the marine environment, *Biochemical Systematics and Ecology*, **1991**, 19, 347-356
- JOHNSON, S.M., Wiseman, R.L., Sekijima, Y., Green, N.S., Adamski-Werner, S.L. & Kelly, J.W.: Native state kinetic stabilization as a strategy to ameliorate protein misfolding diseases: a focus on the transthyretin amyloidoses, *Acc. Chem. Res.*, **2005**, 38, 911-921
- JUNGWIRTH, A., Galvan, G., Pinski, J., Halmos, G., Szepeshazi, K., Cai, R. Z., Groot, K. & Schally, A. V.: Luteinizing hormone-releasing hormone antagonist cetrorelix (SB-75) and bombesin antagonist RC-3940-II inhibit the growth of androgen-independent PC-3 prostate cancer in nude mice, *Prostate*, **1997**, 32, 164-172
- KAPTEIN, R., Boelens, R., Scheek, R.M. & van Gunsteren, W.F.: Protein structures from nmr, *Biochemistry*, **1988**, 27, 5389-5395

- KAPTEIN, R., Zuiderweg, E.R., Scheek, R.M., Boelens, R. & van Gunsteren, W.F.: A protein structure from nuclear magnetic resonance data. lac repressor headpiece., *J. Mol. Biol.*, **1985**, 182(1), 179-182
- KARPLUS, M.: Contact electron–spin coupling of nuclear magnetic moments., *J. Chem. Phys.*, **1959**, 30, 11–15
- KARPLUS, M.: Vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance., *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2870–2871
- KASHIWADA, Y., Nonaka, G., Nishioka, I., Chang, J. & Lee, K.: Antitumor agents, 129. Tannins and related compounds as selective cytotoxic agents, *J. Nat. Prod.*, **1992**, 55(8), 1033-1043
- KELLER, R. L. J.: Optimizing the process of nuclear magnetic resonance spectrum analysis and computer aided resonance assignment, *Dissertation ETH No. 15947*, **2004**, *ETH Zürich*
- KHURANA, R., Coleman, C., Ionescu-Zanetti, C., Carter, S.A., Krishna, V., Grover, R.K., Roy, R. & Singh, S.: Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils, *J. Struct. Biol.*, **2005**, 151(3), 229-238
- KICK, A.: Neue zerstörungsfreie Methoden zur Untersuchung der Aggregation und Komplexierung von Cetrorelix und Ozarelix, *TU Dresden*, **2007**, *Diplomarbeit*
- KLEEMANN, A., Drauz, K., Engel, J., Kutscher, B. & Wunsch, E.: Cetrorelix – a new long acting LHRH antagonist with a very long histaminergic potential, *Akabori-Konferenz*, **1991**
- KLUNK, W.E., Pettegrew, J.W. & Abraham, D.J.: Quantitative evaluation of congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation, *J. Histochem. Cytochem.*, **1989**, 37(8), 1273-1281
- KNOWLES, T.P., Waudby, C.A., Devlin, G.L., Cohen, S.I., Aguzzi, A., Vendruscolo, M., Terentjev, E.M., Welland, M.E. & Dobson, C.M.: An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly, *Science*, **2009**, 326, 1533-1537
- KOKKONI, N., Stott, K., Amijee, H., Mason, J.M. & Doig, A.J.: N-methylated peptide inhibitors of β -amyloid aggregation and toxicity. Optimization of the inhibitor structure, *Biochemistry*, **2006**, 45, 9906-9918
- KONG, J. & YU, S.: Fourier Transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **2007**, 39(8), 549-559
- KÖRNER, P.: Synthese und Charakterisierung von tanninylierten Polysacchariden für die Depotformulierung von GnRH-Antagonisten, **2015**, *Masterarbeit, TU Dresden*
- KÖRNER, P.: Untersuchungen zur Struktur und zum Freisetungsverhalten von Komplexen von GnRH-Antagonisten mit Tannin-Fraktionen, **2013**, *Bachelorarbeit, TU Dresden*
- KORPÁSSY, B. & MOSONYI, M.: The carcinogenic activity of tannic acid. Liver tumours induced in rats by prolonged subcutaneous administration of tannic acid solutions, *Br. J. Cancer*, **1950**, 4(4), 411-420
- KORPÁSSY, B.: The hepatocarcinogenicity of tannic acid, *Cancer Res.*, **1959**, 19, 501-504
- KORTÜM, G.: Reflexionsspektroskopie, **1969**, *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg*

- KOTIK, M., Radford, S.E. & Dobson, C.M.: Comparison of the refolding of hen lysozyme from dimethyl sulfoxide and guanidinium chloride, *Biochemistry*, **1995**, 34, 1714-1724
- KOVACS, M., Schally, A. V., Csernus, B. & Rekasi, Z.: Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) antagonist cetorelix down-regulates the mRNA expression of pituitary receptors for LHRH by counteracting the stimulatory effect of endogenous LHRH, *Proc Natl Acad Sci USA*, **2001**, 98, 1829-1834
- KOVÁCS, M., Schally, A.V., Zarándi, M. & Groot, K.: Inhibition of GH release in rats by new potent antagonists of growth hormone-releasing hormone (GH-RH), *Peptides*, **1997**, 18(3), 431-438
- KRISTOF, W.: Leicht polarisierbare Wasserstoffbrücken zwischen den Seitengruppen von Proteinen, *TU München*, **1979**, *Dissertation*
- KUMAR, M. N. V. R., Muzzarelli, R. A. A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H. & Domb, A. J.: Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives, *Chem Rev*, **2004**, 104, 6017-6084
- KÜPKER, W., Felberbaum, R. & Diedrich, K.: Medikamentöse Therapie der Endometriose mit GnRH-Antagonisten, *Gynäkologe*, **2002**, 35, 243-249
- KUTSCHER, B., Bernd, M., Beckers, T., Polymeropoulos, E. E. & Engel, J.: Chemie und Molekularbiologie bei der Suche nach neuen LHRH-Antagonisten, *Angew Chem*, **1997**, 109, 2240-2254
- LAI, Z., Colón, W. & Kelly, J.W.: The acid-mediated denaturation pathway of transthyretin yields a conformational intermediate that can self-assemble into amyloid, *Biochemistry*, **1996**, 35, 6470-6482
- LAMHARZI, N., Halmos, G., Jungwirth, A. & Schally, A. V.: Decrease in the level and mRNA expression of LHRH and EGF receptors after treatment with LHRH antagonist cetorelix in DU-145 prostate tumor xenografts in nude mice, *Int J Oncol*, **1998**, 13, 429-435
- LANG, A.: Untersuchungen zum Komplexierungs- und Aggregationsverhalten von Cetorelix, *TU Dresden*, **1998**, *Diplomarbeit*
- LANG, A.: Untersuchungen zur Komplexierung von Cetorelix und weiteren GnRH-Analoga mit sich selbst und Partnermolekülen, *TU Dresden*, **2005**, *Dissertation*
- LATAZA ROVALETTI, M.M., Benítez, E.I., Martínez Amezaga, N.M.J., Peruchena, N.M., Sosa, G.L. & Lozano, J.E.: Polysaccharides influence on the interaction between tannic acid and haze active proteins in beer, *Food Research International*, **2014**, 62, 779-785
- LEE, J., Culyba, E.K., Powers, E.T. & Kelly, J.W.: Amyloid- β forms fibrils by nucleated conformational conversion of oligomers, *Nat. Chem. Biol.*, **2011**, 7, 602-609
- LEE, K.Y. & MOONEY, D.J.: Alginate: properties and biomedical applications, *Prog. Polym. Sci.*, **2012**, 37(1), 106-126
- LEES, V.C., Fan, T.P. & West, D.C.: Angiogenesis in a delayed revascularization model is accelerated by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan, *Lab. Invest.*, **1995**, 73(2), 259-266
- LEHR, C. M., Bouwstra, J. A., Schacht, E. H. & Junginger, H. E.: In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers, *International Journal of Pharmaceutics*, **1992**, 78(1), 43-48

- LETSCH, M., Schally, A.V., Stangelberger, A., Groot, K. & Varga, J.L.: Antagonists of growth hormone-releasing hormone (GH-RH) enhance tumour growth inhibition induced by androgen deprivation in human MDA-Pca-2b prostate cancers, *European Journal of Cancer*, **2004**, 40, 436-444
- LEUNG, K., Rajkovic, I.A., Peters, E., Markus, I., Van Wyk, J.J. & Ho, K.K.: Insulin-like growth factor I and insulin down-regulate growth hormone (GH) receptors in rat osteoblasts: evidence for a peripheral feedback loop regulating GH action, *Endocrinology*, **1996**, 137(7), 2694-2702
- LING, N., Baird, A., Wehrenberg, W.B., Ueno, N., Munegumi, T. & Brazeau, P.: Synthesis and in vitro bioactivity of C-terminal deleted analogs of human growth hormone-releasing factor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1984**, 123(2), 854-861
- LIU, F., Kozlovskaya, V., Zavgorodnya, O., Martinez-Lopez, C., Catledge, S. & Kharlampieva, E.: Encapsulation of anticancer drug by hydrogen-bonded multilayers of tannic acid, *Soft Matter*, **2014**, 10(46), 9237-9247
- LIU, L., Liu, Y., Li, J., Du, G. & Chen, J.: Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives, *Microb. Cell Fact.*, **2011**, 10(99), 1-9
- LIU, N., Gao, F., Han, Z., Xu, X., Underhill, C.B. & Zhang, L.: Hyaluronan synthase 3 overexpression promotes the growth of TSU prostate cancer cells, *Cancer Res.*, **2001**, 61(13), 5207-5214
- LIU, Y., Pukala, T.L., Musgrave, I.F., Williams, D.M., Dehle, F.C. & Carver, J.A.: Gallic acid is the major component of grape seed extract that inhibits amyloid fibril formation, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2013**, 23, 6336-6340
- LO, G., LaValley, M., McAlindon, T. & Felson, D.T.: Intra-articular hyaluronic acid in treatment of knee osteoarthritis - a meta-analysis, *JAMA*, **2003**, 290(23), 3115-3121
- LOKESHWAR, V.B., Schroeder, G.L., Selzer, M.G., Hautmann, S.H., Posey, J.T., Duncan, R.C., Watson, R., Rose, L., Markowitz, S. & Soloway, M.S.: Bladder tumor markers for monitoring recurrence and screening comparison of hyaluronic acid-hyaluronidase and BTA-Stat tests, *Cancer*, **2002**, 95(1), 61-72
- MACLEAN, C.M., Skillern, L., Larsen, F., Gres, A., Strotski, A., Dmitrijev, A.V., Dovger, V.K. & Varaksa, A.: Efficacy and safety of teverelix LA, a new GnRH antagonist in patients with benign prostatic hyperplasia (BPH). Results from a phase II randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre, multinational study investigating two single injections of 30 mg or 60 mg (separated by at least 12 weeks) administered sc to treatment naive patients suffering from BPH, *European Urology Supplements*, **2008**, 7(3), 170
- MACLEAN, C.M., Ulys, A., Jankevicius, F., Kaniusas, D., Drewe, J. & Larsen, F.: Efficacy and safety of teverelix, a new gonadotrophin releasing hormone antagonist in patients with advanced prostate cancer. Results from a phase 2 multicentre, open-label, pilot study investigating an initial intramuscular loading dose regimen of teverelix, *European Urology Supplements*, **2006**, 5(2), 251
- MACURA, S. & ERNST, R.R.: Elucidation of cross relaxation in liquids by twodimensional NMR spectroscopy, *Mol. Phys.*, **1980**, 41, 95-117
- MAIGRET, B., Perahia, D. & Pullman, B.: Molecular orbital calculations on the conformation of polypeptides and proteins. IV. The conformation of the prolyl and hydroxyprolyl residues, *J. Theor. Biol.*, **1970**, 29, 275-291

- MAITI, S., Singha, K., Ray, S., Dey, P. & Sa, B.: Adipic acid dihydrazide treated partially oxidized alginate beads for sustained oral delivery of flurbiprofen, *Pharm. Dev. Technol.*, **2009**, 14(5), 461-470
- MAJI, S. K., Schubert, D., Rivier, C., Lee, S., Rivier, J. E. & Riek, R.: Amyloid as a depot for the formulation of long-acting drugs, *PLoS Biology*, **2008**, 6, 240-252
- MARKOM, M., Hasan, M., Daud, W.R.W., Singh, H. & Jahim, J.M.: Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn: effects of solvents and extraction methods, *Sep. Purif. Technol.*, **2007**, 52(3), 487-496
- MARQUARDT, H. & SCHÄFER, S. G.: Lehrbuch der Toxikologie, *Mannheim, BI Wissenschaftsverlag*, **1994**
- MATSUO, H., Baba, Y., Nair, R. M., Arimura, A. & Schally, A. V.: Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence, *Biochem Biophys Res Commun*, **1971**, 43, 1334-1339
- MAUDSLEY, S., Davidson, L., Pawson, A. J., Chan, R., López de Maturana, R. & Millar, R. P.: Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonists promote proapoptotic signaling in peripheral reproductive tumor cells by activating a G_{ai} -coupling state of the type I GnRH receptor, *Cancer Research*, **2004**, 64, 7533-7544
- MAYO, K.E., Cerelli, G.M., Lebo, R.V., Bruce, B.D., Rosenfeld, M.G. & Evans, R.M.: Gene encoding human growth hormone-releasing factor precursor: structure, sequence, and chromosomal assignment, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, 82(1), 63-67
- MCLAURIN, J., Golomb, R., Jurewicz, A., Antel, J.P. & Fraser, P.E.: Inositol stereoisomers stabilize an oligomeric aggregate of Alzheimer amyloid β peptide and inhibit $A\beta$ -induced toxicity, *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 18495-18502
- MENG, X., Munishkina, L.A., Fink, A.L. & Uversky, V.N.: Effects of various flavonoids on the α -synuclein fibrillation process, *Parkinson's Dis.*, **2010**, (V2010), ID 650794
- MERCURIO, M.D. & SMITH, P.A.: Tannin quantification in red grapes and wine: comparison of polysaccharide- and protein-based tannin precipitation techniques and their ability to model wine astringency, *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56(14), 5528-5537
- MILNER-WHITE, E.J.: The partial charge of the nitrogen atom in peptide bonds, *Protein Sci.*, **1997**, 6(11), 2477-2482
- MIYAZAWA, T. & BLOUT, E. R.: The infrared spectra of polypeptides in various conformations: amide I and II bands, *J Am Chem Soc*, **1961**, 83, 712-719
- MOEN, E., Larsen, B. & Østgaard, K.: Aerobic microbial degradation of alginate in *Laminaria hyperborea* stipes containing different levels of polyphenols, *Journal of Applied Phycology*, **1997**, 9, 45-54
- MOORE, R.A., Vorberg, I. & Priola, S.A.: Species barriers in prion disease - brief review, *Arch. Virol. Suppl.*, **2005**, 19, 187-202
- MORRIS, G.A. & FREEMAN, R.: Enhancement of nuclear magnetic resonance signals by polarization transfer, *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101, 760-762
- MOTA, M.L.R., Thomas, G. & Barbossa Filho, J.M.: Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L., *Journal of Ethnopharmacology*, **1985**, 13, 289-300

- MUELLER-HARVEY, I.: Analysis of hydrolysable tannins, *Animal Feed Science and Technology*, **2001**, *91*, 3-20
- MÜLLER, A., Busker, E., Engel, J., Kutscher, B., Bernd, M. & Schally, A.V.: Structural investigation of Cetrorelix, a new potent and long-acting LH-RH antagonist, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1994**, *43*, 264-270
- MÜLLER, L.: Sensitivity enhanced detection of weak nuclei using heteronuclear multiple quantum coherence, *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, *101*(16), 4481-4484
- MURAKAMI, K., Murata, N., Ozawa, Y., Kinoshita, N., Irie, K., Shirasawa, T. & Shimizu, T.: Vitamin C restores behavioral deficits and amyloid- β oligomerization without affecting plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.*, **2011**, *26*(1), 7-18
- MURGAS, S.: Wirkungsmodifizierung von Cetrorelix durch Komplexierung mit Polyaminosäuren und Carbonsäuren als mögliche Depotpräparate für die Tumorthherapie, *TU Dresden*, **1997**, *Dissertation*
- MUZZARELLI, R. A. A.: Chitin, **1977**, *Pergamon Press, Oxford*
- MYSHAKINA, N.S., Ahmed, Z. & Asher, S.A.: Dependence of amide vibrations on hydrogen bonding, *J. Phys. Chem. B*, **2008**, *112*(38), 11873-11877
- NESTOR, J. J., JR., Tahiramani, R., Ho, T. L., Goodpasture, J. C., Vickery, B. H. & Ferrandon, P.: Potent gonadotropin releasing hormone antagonists with low histamine-releasing activity, *J Med Chem*, **1992**, *35*, 3942-3948
- NICOL, S.: Life after death for empty shells, *New Sci*, **1991**, *129*, 46-48
- NIE, Q., Du, X. & Geng, M.: Small molecule inhibitors of amyloid β peptide aggregation as a potential therapeutic strategy for Alzheimer's disease, *Acta Pharmacologica Sinica*, **2011**, *32*, 545-551
- NIEMETZ, R. & GROSS, G.G.: Gallotannin biosynthesis: a new β -glucogallin-dependent galloyltransferase from sumac leaves acylating gallotannins at positions 2 and 4, *Journal of Plant Physiology*, **1999**, *155*, 441-446
- NIHO, N., Shibutani, M., Tamura, T., Toyoda, K., Uneyama, C., Takahashi, N. & Hirose, M.: Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats, *Food Chem. Toxicol.*, **2001**, *39*(11), 1063-1070
- NIKIFOROVICH, G.V. & MARSHALL, G.R.: Conformation-function relationships in LHRH analogs II. Conformations of LHRH peptide agonists and antagonists., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1993**, *42*, 181-193
- NILGES, M., Gronenborn, A.M., Brünger, A.T. & Clore, G.M.: Determination of three-dimensional structures of proteins by simulated annealing with interproton distance restraints. Application to crambin, potato carboxypeptidase inhibitor and barley serine proteinase inhibitor 2, *Protein Eng.*, **1988**, *2*(1), 27-38
- NILSSON, S.F., Rask, L. & Peterson, P.A.: Studies on thyroid hormone-binding proteins. II. Binding of thyroid hormones, retinol-binding protein, and fluorescent probes to prealbumin and effects of thyroxine on prealbumin subunit self association, *J. Biol. Chem.*, **1975**, *250*, 8554-8563
- NISHIZAWA, M., Yamagishi, T., Nonaka, G.I. & Nishioka, I.: Tannins and related compounds. Part 5. Isolation and characterization of polygalloylglucose from chinese gallotannin, *J. Chem. Soc.*, **1982**, *Perkin Trans. 1*, 2963-2968

- NOGGLE, J.H. & SCHIRMER, R.H.: The nuclear Overhauser effect. Chemical applications, **1971**, *Academics*, New York
- NORONHA, M., Lima, J. C., Bastos, M., Santos, H. & Maçanita, A. L.: Unfolding of ubiquitin studied by picoseconds time-resolved fluorescence of the tyrosine residue, *Biophysical Journal*, **2004** [2], 87, 2609-2620
- NORONHA, M., Lima, J. C., Lamosa, P., Santos, H., Maycock, C., Ventura, R. & Maçanita, A. L.: Intramolecular fluorescence quenching of tyrosine by the peptide α -carbonyl group revisited, *J Phys Chem A*, **2004** [1], 108, 2155-2166
- OKUDA, T., Shida, T. & Tano, T.: New methods of analyzing tannins, *Journal of Natural Products*, **1989**, 52, 1-31
- OLIVENNES, F., Alvarez, S., Bouchard, P., Fanchin, R., Salat-Baroux, J. & Frydman, R.: The use of a GnRH antagonist (Cetrorelix) in a single dose protocol in IVF-embryo transfer: a dose finding study of 3 versus 2 mg, *Hum Reprod*, **1998**, 13, 2411-2414
- ONO, K., Hasegawa, K., Naiki, H. & Yamada, M.: Anti-amyloidogenic activity of tannic acid and its activity to destabilize Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2004**, 1690, 193-202
- ONODERA, H., Kitaura, K., Mitsumori, K., Yoshida, J., Yasuhara, K., Shimo, T., Takahashi, M. & Hayashi, Y.: Study on the carcinogenicity of tannic acid in F344 rats, *Food Chem. Toxicol.*, **1994**, 32(12), 1101-1106
- ORIVE, G., Ponce, S., Hernández, R.M., Gascón, A.R., Igartua, M. & Pedraz, J.L.: Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates, *Biomaterials*, **2002**, 23(18), 3825-3831
- OTTERLEI, M., Ostgaard, K., Skjåk-Braek, G., Smidsrød, O., Soon-Shiong, P. & Espevik, T.: Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate, *J. Immunother.*, **1991**, 10(4), 286-291
- OYARZUN-AMPUERO, F.A., Rivera-Rodríguez, G.R., Alonso, M.J. & Torres, D.: Hyaluronan nanocapsules as a new vehicle for intracellular drug delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2013**, 49(4), 483-490
- PAL, D. & CHAKRABARTI, P.: Cis peptide bonds in proteins: residues involved, their conformations, interactions and locations, *J. Mol. Biol.*, **1999**, 294, 271-288
- PAN, K.M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J. & Cohen, F.E.: Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90(23), 10962-10966
- PAPPA, E. V., Zompra, A. A., Spyrali, Z., Diamantopoulou, Z., Pairas, G., Lamari, F. N., Katsoris, P., Spyroulias, G. A. & Cordopatis, P.: Enzymatic stability, solution structure, and antiproliferative effect on prostate cancer cells of leuprolide and new gonadotropin-releasing hormone peptide analogs, *Peptide Science*, **2010**, 96(3), 260-272
- PIETZSCH, D.: Untersuchungen zur Eignung von Chitosan für die Gewinnung von Cetrorelix-Einschlusskomplexen, *TU Dresden*, **2009**, *Bachelorarbeit*
- PINSKI, J., Lamharzi, N., Halmos, G., Groot, K., Jungwirth, A., Vadillobuenfil, M., Kakar, S. S. & Schally, A. V.: Chronic administration of the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)

- antagonist cetorelix decreases gonadotrope responsiveness and pituitary LHRH receptor messenger ribonucleic acid levels in rats, *Endocrinology*, **1996**, *137*, 3430-3436
- PLOTSKY, P.M. & VALE, W.: Patterns of growth hormone-releasing factor and somatostatin secretion into the hypophysial-portal circulation of the rat, *Science*, **1985**, *230*(4724), 461-463
- POSSINGER, K., Grosse, Y. & Petrides, P. E.: Endokrine Therapie solider Tumore, *Internist*, **1998**, *39*, 1123-1130
- POWELL, M. F., Fleitman, J., Sanders, L. M. & Si, V. C.: Peptide liquid crystals: Inverse correlation of kinetic formation and thermodynamic stability in aqueous solution, *Pharmaceutical Research*, **1994**, *11*(9), 1352-1354
- RAJALAKSHMI, K., Devaraj, H. & Niranjali Devaraj, S.: Assessment of the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of gallic acid in mice, *Food Chem. Toxicol.*, **2001**, *39*(9), 919-922
- RATTEL, T.: Beiträge zur Aufklärung der chemischen Natur von Cetorelix-Polyaminosäure- bzw. Cetorelix-Carbonsäurekomplexen sowie deren quantitativer Bestimmung mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie, *TU Dresden*, **1995**, *Diplomarbeit*
- RATTEL, T.: Entwicklung und Charakterisierung von Komplexen aus Cetorelix und biophilen Trägermaterialien, *TU Dresden*, 2002, *Dissertation*
- REINKE, A.A. & GESTWICKI, J.E.: Insight into amyloid structure using chemical probes. *Chem Biol. Drug. Des.*, **2011**, *77*, 399-411
- RESENDE, R., Ferreira, E., Pereira, C. & Resende de Oliveira, C.: Neurotoxic effect of oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptide 1-42: involvement of endoplasmic reticulum calcium release in oligomer-induced cell death, *Neuroscience*, **2008**, *155*, 725-737
- RICK, F.G., Szalontay, L., Schally, A.V., Block, N.L., Nadji, M., Szepeshazi, K., Vidaurre, I., Zarandi, M., Kovacs, M. & Rekasi, Z.: Combining growth hormone-releasing hormone antagonist with luteinizing hormone-releasing hormone antagonist greatly augments benign prostatic hyperplasia shrinkage, *J. Urol.*, **2012**, *187*(4), 1498-1504
- RINAUDO, M.: Chitin and chitosan: properties and applications, *Progress in Polymer Science*, **2006**, *31*, 603-632
- RIVIER, J., Spiess, J., Thorner, M. & Vale, W.: Characterization of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumour, *Nature*, **1982**, *300*(5889), 276-278
- ROBBERECHT, P., Coy, D.H., Waelbroeck, M., M.L., de Neef, P., Camus, J.-C. & Christophe, J.: Structural requirements for the activation of rat anterior pituitary adenylate cyclase by growth hormone-releasing factor (GRF): Discovery of (N-Ac-Tyr¹, D-Arg²)-GRF(1-29)-NH₂ as a GRF antagonist on membranes, *Endocrinology*, **1985**, *117*, 1759-1764
- ROBERTS, C.T. JR., Brown, A.L., Graham, D.E., Seelig, S., Berry, S., Gabbay, K.H. & Rechler, M.M.: Growth hormone regulates the abundance of insulin-like growth factor I RNA in adult rat liver, *J. Biol. Chem.*, **1986**, *261*, 10025-10028
- ROPPONEN, K., Tammi, M., Parkkinen, J., Eskelinen, M., Tammi, R., Lipponen, P., Agren, U., Alhava, E. & Kosma, V.M.: Tumor cell-associated hyaluronan as an unfavorable prognostic factor in colorectal cancer, *Cancer Res.*, **1998**, *58*(2), 342-347
- ROSS, C.A. & TABRIZI, S.J.: Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment, *Lancet Neurol.*, **2011**, *10*, 83-98

- ROYCHAUDHURI, R., Yang, M., Hoshi, M.M. & Teplow, D.B.: Amyloid β -protein assembly and Alzheimer disease, *J. Biol. Chem.*, **2009**, 284, 4749-4753
- SARVER, R. W., JR. & KRUEGER, C. W.: Protein secondary structure from fourier transform infrared spectroscopy: A data base analysis, *Anal Biochem*, **1991**, 194, 89-100
- SAUNDERS, M., Wishnia, A. & Kirkwood, J.G.: The nuclear magnetic resonance spectrum of ribonuclease, *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79(12), 3289-3290
- SCALBERT, A.: Antimicrobial properties of tannins, *Phytochemistry*, **1991**, 30, 3875-3883
- SCHALLY, A. V., Arimura, A., Baba, Y., Nair, R. M., Matsuo, H., Redding, T. W. & Debeljuk, L.: Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone, *Biochem Biophys Res Commun*, **1971**, 43, 393-399
- SCHALLY, A. V., Comaru-Schally, A. M., Nagy, A., Kovacs, M., Szepeshazi, K., Plonowski, A., Varga, J. L. & Halmos, G.: Peptide analogs in the therapy of prostate cancer, *Front Neuroendocrinol*, **2001**, 22, 248-291
- SCHAMBERGER, A.: Chitosanhydrogele als Matrix zur Entwicklung von Depotsystemen für GnRH-Antagonisten mit retardierter Wirkstofffreisetzung, **2014**, *Dissertation, TU Dresden*
- SCHNEIDER, A., Lang, A. & Naumann, W.: Fluorescence spectroscopic determination of the critical aggregation concentration of the GnRH antagonists Cetrorelix, Teverelix and Ozarelix, *J Fluoresc*, **2010**, 20, 1233-1240
- SCHREIBER, S.B.: Chitosan-gallic acid films as multifunctional food packaging, **2012**, *Master thesis, University of Tennessee - Knoxville*
- SCHULZ, S., Röcken, C. & Schulz, S.: Immunocytochemical localisation of plasma membrane GHRH receptors in human tumours using a novel anti-peptide antibody, *European Journal of Cancer*, **2006**, 42, 2390-2396
- SCHWIETERS, C. D., Kuszewski, J. J. & Clore, G.M.: Using Xplor-NIH for NMR molecular structure determination, *Progr. NMR Spectroscopy*, **2006**, 48, 47-62
- SCHWIETERS, C.D., Kuszewski, J.J., Tjandra, N. & Clore, G.M.: The XPLOR-NIH nmr molecular structure determination package, *J. Magn. Reson.*, **2003**, 160, 65-73
- SETÄLÄ, L.P., Tammi, M., Tammi, R., Eskelinen, M., Lipponen, P., Agren, U., Parkkinen, J., Alhava, E. & Kosma, V.M.: Hyaluronan expression in gastric cancer cells is associated with local and nodal spread and reduced survival rate, *Br. J. Cancer*, **1999**, 79(7-8), 1133-1138
- SHAVER, L.A., Leung, S.H., Puderbaugh, A. & Angel, S.A.: Two methods of determining total phenolic content of foods and juices in a general, organic, and biological (GOB) Chemistry Lab, *Journal of Chemical Education*, **2011**, 88(4), 492-495
- SHUSTER, S., Frost, G.I., Csoka, A.B., Formby, B. & Stern, R.: Hyaluronidase reduces human breast cancer xenografts in SCID mice, *Int. J. Cancer*, **2002**, 102, 192-197
- SHUTAVA, T.G. & LVOV, Y.M.: Nano-engineered microcapsules of tannic acid and chitosan for protein encapsulation, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2006**, 6(6), 1655-1661
- SIEJKA, A., Lawnicka, H., Melen-Mucha, G., Motylewska, E., Komorowski, J. & Stepień, H.: Antineoplastic action of growth hormone-releasing hormone (GHRH) antagonists, *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, **2012**, 7, 56-63

- SINGH, P.K., Kumbhakar, M., Pal, H. & Nath, S.: Ultrafast bond twisting dynamics in amyloid fibril sensor, *J. Phys. Chem.*, **2010**, *114*, 2541-2546
- SIPE, J.D.: Amyloid Proteins - the beta sheet conformation and disease, **2005**, *Wiley-VCH, Weinheim*
- SKOOG, D. A. & LEARY, J. J.: Instrumentelle Analytik, *4. Auflage*, **1996**, *Springer-Verlag*
- SLAVIK, J.: Anilinnaphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function, *Biochim. Biophys. Acta*, **1982**, *694*, 1-25
- SMITH, J., Wood, E. & Dornish, M.: Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions, *Pharm. Res.*, **2004**, *21(1)*, 43-49
- SOSNIK, A., das Neves, J. & Sarmiento, B.: Mucoadhesive polymers in the design of nano-drug delivery systems for administration by non-parenteral routes: a review, *Prog. Polym. Sci.*, **2014**, *39*, 2030-2075
- STEJSKAL, E.O. & TANNER, J.E.: Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient, *J. Chem. Phys.*, **1965**, *42*, 288-292
- STRAUSS, E.J., Hart, J.A., Miller, M.D., Altman, R.D. & Rosen, J.E.: Hyaluronic acid viscosupplementation and osteoarthritis - current uses and future directions, *Am. J. Sports Med.*, **2009**, *37(8)*, 1636-1644
- STRYER, L.: The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin. A fluorescent probe of non-polar binding sites, *J. Mol. Biol.*, **1965**, *13(2)*, 482-495
- SUREWICZ, K. W., Mantsch, H. H. & Chapman, D.: Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: A critical assessment, *Biochemistry*, **1993**, *32*, 389-394
- SUSI, H. & BYLER, D.M.: Resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy of enzymes, *Methods Enzymol.*, **1986**, *130*, 290-311
- SZEPESHAZI, K., Schally, A.V., Groot, K., Armatis, P., Hebert, F. & Halmos, G.: Antagonists of growth hormone-releasing hormone (GH-RH) inhibit in vivo proliferation of experimental pancreatic cancers and decrease IGF-II levels in tumours, *European Journal of Cancer*, **2000**, *36*, 128-136
- TARLATZIS, B.C. & KOLIBIANAKIS, E.M.: GnRH agonists vs. antagonists, *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gyn.*, **2007**, *21*, 57-65
- THOMAS, P.D. & DILL, K.A.: Local and nonlocal interactions in globular proteins and mechanisms of alcohol denaturation, *Protein Sci.*, **1993**, *2(12)*, 2050-2065
- THORNER, M.O., Rogol, A.D., Blizzard, R.M., Klingensmith, G.J., Najjar, J., Misra, R., Burr, I., Chao, G., Martha, P., McDonald, J., Pezzoli, S., Chitwood, J., Furlanetto, R., River, J., Vale, W., Smith, P. & Brook, C.: Acceleration of growth rate in growth hormone-deficient children treated with human growth hormone-releasing hormone, *Pediatr. Res.*, **1988**, *24(2)*, 145-151
- TIAN, F., Li, B., Ji, B., Zhang, G. & Luo, Y.: Identification and structure-activity relationship of gallotannins separated from *Galla chinensis*, *LWT - Food Science and Technology*, **2009**, *42*, 1289-1295
- TOKORO, A., Tatewaki, N., Suzuki, K., Mikami, T., Suzuki, S. & Suzuki, M.: Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetyl-chitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **1988**, *36*, 784-790

- TOMITA, T.: At the frontline of Alzheimer's disease treatment: gamma-secretase inhibitor/ modulator mechanism, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **2008**, 377, 295-300
- TOOLE, B.P., Wight, T.N. & Tammi, M.: Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease, *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 4593-4596
- TOOLE, B.P.: Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue, *Nature Reviews Cancer*, **2004**, 4, 528-539
- TREUSCH, S., Cyr, D.M. & Lindquist, S.: Amyloid deposits: protection against toxic protein species?, *Cell Cycle*, **2009**, 8(11), 1668-1674
- TURLEY, E.A., Noble, P.W. & Bourguignon, L.Y.: Signaling properties of hyaluronan receptors, *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277(7), 4589-4592
- UVERSKY, V.N.: Neuropathology, biochemistry, and biophysics of α -synuclein aggregation, *J. Neurochem.*, **2007**, 103, 17-37
- VAN LOENEN, A. C., Huirne, J. A., Schats, R., Hompes, P. G. & Lambalk, C. B.: GnRH agonists, antagonists and assisted conception, *Semin Reprod Med*, **2002**, 20, 349-364
- VASSAR, P.S. & CULLING, C.F.: Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues, *Arch. Pathol.*, **1959**, 68, 487-498
- VASSAR, R. & CITRON, M.: Abeta-generating enzymes: recent advances in beta- and gamma-secretase research, *Neuron*, **2000**, 27, 419-422
- VIJAYAN, E. & VARIYAR, J.: Mammalian Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH): An overview. In: Comparative Endocrinology and Reproduction, K. P. Joy, A. Krishna & C. Halder, *New Delhi, Narosa Publishing House*, **1999**, 3-15
- VIRCHOW, R.: Zur Cellulose-Frage, *Virchows Arch. Pathol. Anat.*, **1854**, 6, 416-426
- VON ANGERER, E.: Entwicklungsstrategien für Arzneistoffe zur Therapie hormonabhängiger Tumore, *Pharmazie in unserer Zeit*, **1996**, 25(2), 74-84
- VORLÄNDER, D.: Die Erforschung der molekularen Gestalt mit Hilfe der kristallinen Flüssigkeiten, *Z Phys Chem*, **1923**, 105, 211-254
- WAGNER, G. & WÜTHRICH, K.: Sequential resonance assignments in protein ^1H nuclear magnetic resonance spectra: Basic pancreatic trypsin inhibitor, *J. Mol. Biol.*, **1982**, 155, 347-366
- WANG, C.Y., Chiu, C.W., Pamukcu, A.M. & Bryan, G.T.: Identification of carcinogenic tannin isolated from Bracken fern (*Pteridium aquilinum*), *J. Natl. Cancer Inst.*, **1976**, 56(1), 33-36
- WIDNER, B., Behr, R., Von Dollen, S., Tang, M., Heu, T., Sloma, A., Sternberg, D., Deangelis, P.L., Weigel, P.H. & Brown, S.: Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2005**, 71(7), 3747-3752
- WILLIAMSON, M.P. & WALTHO, J.P.: Peptide structure from nmr, *Chem. Soc. Rev.*, **1992**, 21, 227-236
- WILLIAMSON, M.P., Havel, T.F. & Wüthrich, K.: Solution conformation of proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by ^1H nuclear magnetic resonance and distance geometry, *J. Mol. Biol.*, **1985**, 182(2), 295-315

- WOLFE, K.J. & CYR, D.M.: Amyloid in neurodegenerative disease: friend or foe?, *Semin. Cel Dev. Biol.*, **2011**, 22(5), 476-481
- WU, C., Wang, Z., Lei, H., Duan, Y., Bowers, M.T. & Shea, J.E.: The binding of thioflavin T and its neutral analog BTA-1 to protofibrils of the Alzheimer's disease Abeta(16-22) peptide probed by molecular dynamics simulations, *J. Mol. Biol.*, **2008**, 384, 718-729
- WU, C., Wang, Z., Lei, H., Zhang, W. & Duan, Y.: Dual binding modes of Congo red to amyloid protofibril surface observed in molecular dynamics simulations, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 1225-1232
- WU, D., Chen, A. & Johnson, Jr. C.S.: An improved diffusion-ordered spectroscopy experiment incorporating bipolar-gradient pulses, *J. Magn. Reson. Series A*, **1995**, 115, 260-264
- WÜTHRICH, K., Wider, G., Wagner, G. & Braun, W.: Sequential resonance assignments as a basis for determination of spatial protein structures by high resolution proton nuclear magnetic resonance, *J. Mol. Biol.*, **1982**, 155, 311-320
- WÜTHRICH, K.: Minireview: Protein structure determination in solution by nmr spectroscopy, *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265(36), 22059-22062
- WÜTHRICH, K.: NMR of proteins and nucleic acids, **1986**, *John Wiley & Sons*, New York
- YALLAMPALLI, S., Micci, M.-A. & Tagliatalata, G.: Ascorbic acid prevents β -amyloid-induced intracellular calcium increase and cell death in PC12 cells, *Neuroscience Letters*, **1998**, 251(2), 105-108
- YANG, B. & LIU, P.: Composition and biological activities of hydrolyzable tannins of fruits of *Phyllanthus emblica*, *J. Agric. Food Chem.*, **2014**, 62(3), 529-541
- YANG, Z., Liang, G., Ma, M., Gao, Y. & Xu, B.: Conjugates of naphthalene and dipeptides produce molecular hydrogelators with high efficiency of hydrogelation and superhelical nanofibers, *J. Mater. Chem.*, **2007**, 17, 850-854
- YU, H. & STEPHANOPOULOS, G.: Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid, *Metab. Eng.*, **2008**, 10(1), 24-32
- ZARÁNDI, M., Horváth, J.E., Halmos, G., Pinski, J., Nagy, A., Groot, K., Rékási, Z. & Schally, A.V.: Synthesis and biological activities of highly potent antagonists of growth hormone-releasing hormone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, 91, 1298-1301
- ZARGER, V., Asghari, M. & Dashti, A.: A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications, *Chem. Bio. Eng. Reviews*, **2015**, 2(3), 204-226
- ZHANG, J. & GERMANN, M.W.: Characterization of secondary amide peptide bonds isomerization: thermodynamics and kinetics from 2D NMR spectroscopy, *Biopolymers*, **2011**, 95(11), 755-762

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Primärstruktur von GnRH-I [Lang, 2005].....	1
Abb. 2:	Darstellung der Primärstrukturen der GnRH-Antagonisten Cetrorelix, Teverelix und Ozarelix [Schneider et al., 2010].....	4
Abb. 3:	Aminosäuresequenz des für die Wirkung relevanten, 29 Aminosäurereste umfassenden N-terminalen GHRH-Fragmentes (C-terminal amidiert)	7
Abb. 4:	Strukturformeln der niedermolekularen Amyloid-Inhibitoren Tafamidis, Epigallocatechin-gallat (EGCG) und <i>Scyllo</i> -Inositol	12
Abb. 5:	Röntgenkristallstruktur des tetrameren Transthyretin im Komplex mit Tafamidis (PDB ID: 2QGE) [nach: Härd & Lendel, 2012].....	13
Abb. 6:	Strukturformeln der Hydrophobie-Sonde Ammonium-1,8-anilino-naphthalinsulfonat (ANS), sowie der Amyloid-Sonden Thioflavin T (ThioT) und Kongorot	16
Abb. 7:	Visualisierung der 4 Grundphasen zweidimensionaler NMR-Verfahren sowie der Pulssequenzen der homonuklearen COSY-, NOESY-, TOCSY- und ROESY-Experimente	19
Abb. 8:	Grundlegende Pulsfolgen der heteronuklearen INEPT-, HSQC- und HMBC-Experimente.....	22
Abb. 9:	Darstellung der grundlegenden Pulssequenzen von ¹ H-DOSY-Experimenten	23
Abb. 10:	Strukturformeln der beiden verschiedenen Monomereinheiten von Chitosan (links: β -D-Glucosamin; rechts: N-Acetyl- β -D-Glucosamin)	27
Abb. 11:	Strukturformeln der beiden verschiedenen Monomereinheiten von Alginat (links: α -L-Guluronsäure; rechts: β -D-Mannuronsäure)	29
Abb. 12:	Strukturformel der Disaccharideinheit von Hyaluronsäure, bestehend aus β (1 \rightarrow 3)-glykosidisch mit N-Acetyl- β -D-Glucosamin verknüpfter β -D-Glucuronsäure	30
Abb. 13:	Schema der gerichteten Galloylierung im Zuge der Biosynthese von 1,2,3,4,6-O-Pentagalloyl- β -D-Glukose (PGG) [modifiziert nach: Grundhöfer et al., 2001]	32
Abb. 14:	HPLC-Chromatogramme der Kalibrierung zur Cetrorelix-Gehaltsbestimmung an der HPLC-Anlage 2 der Firma Beckman	47
Abb. 15:	HPLC-Chromatogramme der Kalibrierung zur Ozarelix-Gehaltsbestimmung an der HPLC-Anlage 2 der Firma Beckman	48
Abb. 16:	HPLC-Chromatogramme der Kalibrierung zur Teverelix-Gehaltsbestimmung an der HPLC-Anlage 2 der Firma Beckman	49
Abb. 17:	Software-System zur Berechnung von dreidimensionalen Peptidstrukturen auf Basis von NMR-spektroskopisch bestimmten distance restraints	73

Abb. 18:	Kalibriergeraden der Phenolgehaltsbestimmung mit Eisen(III)-chlorid-Reagens für Gallussäure und die ungetrennte Gallotanninmischung aus <i>Rhus chinensis</i>	77
Abb. 19:	Kalibriergeraden der Phenolgehaltsbestimmung mit Eisen(III)-chlorid-Reagens für die drei Tanninspezies 3GG, 4GG und PGG.....	77
Abb. 20:	Zeitlicher Ablauf des optimierten Elutionsprogrammes der Stufentrennung der Gallotanninmischung aus <i>Rhus chinensis</i> an Sephadex LH-20	78
Abb. 21:	Schematische Übersicht der wesentlichen Teilschritte der Gewinnung einzelner Tanninspezies über ein methanolyse-basiertes Trennverfahren	81
Abb. 22:	Schematischer Aufbau der verwendeten Dialyseliberationsapparatur zur Untersuchung des Freisetungsverhaltens von GnRH-Antagonisten-Formulierungen mit biophilen Partner-molekülen.....	93
Abb. 23:	Bandenformanalyse der Amid I-Bande des Cetorelix-Fragmentes Cx[1-4]; links: Gegenüberstellung von experimentell bestimmter und berechneter Amid I-Bande; rechts: Darstellung der einzelnen sekundärstrukturspezifischen Gaußfunktionen.....	101
Abb. 24:	Bandenformanalyse der Amid I-Bande des Cetorelix-Fragmentes Cx[1-6]; links: Gegenüberstellung von experimentell bestimmter und berechneter Amid I-Bande; rechts: Darstellung der einzelnen sekundärstrukturspezifischen Gaußfunktionen.....	102
Abb. 25:	Bandenformanalyse der Amid I-Bande des Cetorelix-Fragmentes Cx[1-9]; links: Gegenüberstellung von experimentell bestimmter und berechneter Amid I-Bande; rechts: Darstellung der einzelnen sekundärstrukturspezifischen Gaußfunktionen.....	103
Abb. 26:	Bandenformanalyse der Amid I-Bande des vollständigen Cetorelix-Dekaepetides; links: Gegenüberstellung von experimentell bestimmter und berechneter Amid I-Bande; rechts: Darstellung der einzelnen sekundärstrukturspezifischen Gaußfunktionen.....	104
Abb. 27:	Quantitative Auswertung der Bandenformanalyse der Amid I-Bande von Aggregaten der Cetorelix-Fragmente Cx[1-4], Cx[1-6] und Cx[1-9], sowie des aggregierten und des bei niedrigem pH-Wert ungeordnet lyophilisierten Cetorelix-Dekaepetides (ungeordnetes Dekaepetid mit * gekennzeichnet).....	105
Abb. 28:	ATR-FTIR-Spektren von amyloid-aggregiertem und bei niedrigem pH-Wert ungeordnet lyophilisiertem Teverelix-Acetat.....	106
Abb. 29:	Bandenformanalyse der Amid I-Bande des vollständigen Teverelix-Dekaepetides; links: Gegenüberstellung von experimentell bestimmter und berechneter Amid I-Bande; rechts: Darstellung der einzelnen sekundärstrukturspezifischen Gaußfunktionen.....	107
Abb. 30:	Bandenformanalyse der Amid I-Bande des vollständigen Ozarelix-Dekaepetides; links: Gegenüberstellung von experimentell bestimmter und berechneter Amid I-Bande; rechts: Darstellung der einzelnen sekundärstrukturspezifischen Gaußfunktionen.....	107

Abb. 31:	Quantitative Auswertung der Bandenformanalyse der Amid I-Bande von Aggregaten der GnRH-Antagonisten Cetrorelix, Teverelix und Ozarelix, sowie des Cetrorelix-Fragmentes Cx[1-9] und des Di-Tertbutyl-geschützten Cetrorelix-Derivates DG-420099	108
Abb. 32:	Sekundärstrukturverteilung von Cetrorelix-Proben in Abhängigkeit vom pH-Wert während der Inkubation und von der Inkubationsdauer.....	109
Abb. 33:	Sekundärstrukturverteilung von Teverelix-Proben in Abhängigkeit vom pH-Wert während der Inkubation und von der Inkubationsdauer.....	110
Abb. 34:	Sekundärstrukturverteilung von Ozarelix-Proben in Abhängigkeit vom pH-Wert während der Inkubation und von der Inkubationsdauer.....	111
Abb. 35:	Konzentrationsabhängige Entwicklung der Relation zwischen den präexponentiellen Faktoren B_1 und B_2 der unterschiedlichen rotameren Zustände des Tyr⁵-Restes von Teverelix in 10 mM Ammoniumacetat-Lösung (pH 7,0).....	113
Abb. 36:	Aufnahmen von GnRH-Antagonisten-Lösungen bei gekreuzten, linearen Polarisationsfiltern in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration	114
Abb. 37:	Veränderung der Kongorot-Absorption in Cetrorelix-Lösung mit einer Peptidkonzentration von 1 mg/ml in Ethanol/Wassergemischen in Abhängigkeit von Solvenszusammensetzung und Temperatur	115
Abb. 38:	Visualisierung des Überganges von monomeren zu hexameren Strukturen von Cetrorelix bei einer Peptidkonzentration von 1 mg/ml in Ethanol/Wasser-Gemischen in Abhängigkeit von Temperatur und Solvenszusammensetzung	116
Abb. 39:	Visualisierung des Überganges von monomeren zu hexameren Strukturen, sowie zwischen isotroper und nematischer Mesophase von Cetrorelix bei einer Peptidkonzentration von 10 mg/ml in Ethanol/Wasser-Gemischen in Abhängigkeit von Temperatur und Solvenszusammensetzung	117
Abb. 40:	Visualisierung des Überganges von monomeren zu hexameren Strukturen von Ozarelix bei einer Peptidkonzentration von 1 mg/ml in Ethanol/Wasser-Gemischen in Abhängigkeit von Temperatur und Solvenszusammensetzung	119
Abb. 41:	Polarisationsmikroskopische Aufnahmen von Cetrorelix-Festkörpern bei gekreuzten, linearen Polarisationsfiltern; links: Ergebnis aus Beil, 2012(1); rechts: erhaltener Festkörper bei verlangsamter Ammoniak-Zufuhr; dargestellter Ausschnitt 2 x 2 mm	120
Abb. 42:	Veranschaulichung der beiden Ansätze zur temperatur-induzierten Kristallisation von Cetrorelix-Aggregaten aus Ethanol/Wasser-Gemischen mit 18,4 Vol.-% bzw. 30,0 Vol.-% Ethanol; Pfeilspitze markiert die erreichten Bedingungen zum Ende des Experimentes.....	121
Abb. 43:	Polarisationsmikroskopische Aufnahmen des Ansatzes zur Kristallisation von Cetrorelix-Aggregaten aus einem	

	Ethanol/Wassergemisch mit 30,0 Vol.-% Ethanol nach 14 Tagen bei 40-facher Vergrößerung; links: Aufnahme bei paralleler Anordnung der linearen Polarisationsfilter; rechts: Aufnahme bei gekreuzter Anordnung der linearen Polarisationsfilter.....	122
Abb. 44:	Polarisationsmikroskopische Aufnahmen des Ansatzes zur Kristallisation von Cetorelix-Aggregaten aus einem Ethanol/Wassergemisch mit 18,4 Vol.-% Ethanol nach 14 Tagen bei 40-facher Vergrößerung; links: Aufnahme bei paralleler Anordnung der linearen Polarisationsfilter; rechts: Aufnahme bei gekreuzter Anordnung der linearen Polarisationsfilter.....	123
Abb. 45:	Polarisationsmikroskopische Aufnahme einer mittels Kongorot gefärbten Probe des Kristallisationsansatzes von Cetorelix-Aggregaten aus einer Lösung mit 18,4 Vol.-% Ethanol bei gekreuzten, linearen Polarisationsfiltern mit 40-facher Vergrößerung....	124
Abb. 46:	Detailansicht eines doppelbrechenden Objektes aus dem Kristallisationsansatz von Cetorelix-Aggregaten aus einem Ethanol/Wasser-Gemisch mit 18,4 Vol.-% Ethanol bei paralleler Anordnung (links) bzw. gekreuzter Anordnung (rechts) der Polarisationsfilter	124
Abb. 47:	Verwendete Nomenklatur für die Zuordnung der NMR-Signale von Cetorelix (Sequenz: Ac-D-Nal(2) ¹ -D-Phe(4Cl) ² -D-Pal(3) ³ -Ser ⁴ -Tyr ⁵ -D-Cit ⁶ -Leu ⁷ -Arg ⁸ -Pro ⁹ -D-Ala-NH ₂ ¹⁰)	125
Abb. 48:	¹ H/ ¹³ C-HSQC-Spektrenausschnitt von Cetorelix-Acetat in DMSO-d ₆ im Bereich der Methyl- und Methylen-Signale	126
Abb. 49:	¹ H/ ¹³ C-HSQC-Spektrenausschnitt von Cetorelix-Acetat in DMSO-d ₆ im Bereich der α-CH-Gruppierungen der Aminosäure-Reste, sowie der β-CH ₂ -Gruppen von Pro ⁹ & Ser ⁴	127
Abb. 50:	¹ H/ ¹³ C-HSQC-Spektrenausschnitt von Cetorelix-Acetat in DMSO-d ₆ im Bereich der aromatischen CH-Gruppierungen.....	128
Abb. 51:	¹ H/ ¹⁵ N-HSQC-Spektrum von Cetorelix-Acetat in DMSO-d ₆	129
Abb. 52:	Verwendete Nomenklatur für die Zuordnung der NMR-Signale von Ozarelix (Sequenz: Ac-D-Nal(2) ¹ -D-Phe(4Cl) ² -D-Pal(3) ³ -Ser ⁴ -Tyr(Me) ⁵ -D-Hcit ⁶ -Nle ⁷ -Arg ⁸ -Pro ⁹ -D-Ala-NH ₂ ¹⁰).....	130
Abb. 53:	¹ H/ ¹³ C-HSQC-Spektrenausschnitt von Ozarelix-Acetat in DMSO-d ₆ im Bereich der Methyl- und Methylen-Signale	130
Abb. 54:	¹ H/ ¹³ C-HSQC-Spektrenausschnitt von Ozarelix-Acetat in DMSO-d ₆ im Bereich der α-CH-Gruppierungen der Aminosäure-Reste, sowie der β-CH ₂ -Gruppen von Pro ⁹ & Ser ⁴	131
Abb. 55:	¹ H/ ¹³ C-HSQC-Spektrenausschnitt von Ozarelix-Acetat in DMSO-d ₆ im Bereich der aromatischen CH-Gruppierungen.....	132
Abb. 56:	¹ H/ ¹⁵ N-HSQC-Spektrum von Ozarelix-Acetat in DMSO-d ₆	133
Abb. 57:	Verwendete Nomenklatur für die Zuordnung der NMR-Signale von Teverelix (Sequenz: Ac-D-Nal(2) ¹ -D-Phe(4Cl) ² -D-Pal(3) ³ -Ser ⁴ -Tyr ⁵ -D-Hcit ⁶ -Leu ⁷ -Lys(iPr) ⁸ -Pro ⁹ -D-Ala-NH ₂ ¹⁰).....	133

Abb. 58:	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrenausschnitt von Teverelix-Acetat in DMSO-d_6 im Bereich der Methyl- und Methylen-Signale.....	134
Abb. 59:	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrenausschnitt von Teverelix-Acetat in DMSO-d_6 im Bereich der α -CH-Gruppierungen der Aminosäure-Reste, sowie der β -CH ₂ -Gruppen von Pro ⁹ & Ser ⁴	135
Abb. 60:	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrenausschnitt von Teverelix-Acetat in DMSO-d_6 im Bereich der aromatischen CH-Gruppierungen.....	136
Abb. 61:	$^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von Teverelix-Acetat in DMSO-d_6	136
Abb. 62:	Vergleich der $^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY-Spektren von Teverelix-Acetat (links) und Teverelix-Trifluoracetat (rechts) in DMSO-d_6 im Bereich der aromatischen ^1H -Signale; rot markiert: verschobene Kreuzpeaks von D-Pal(3) ³	137
Abb. 63:	Ausschnitt aus einem $^1\text{H}/^1\text{H}$ -ROESY-Spektrum zur Veranschaulichung der auftretenden Spindiffusion zwischen verschiedenen ^1H -Kernen des Naphthyl-Rings von Ac-D-Nal(2) ¹ von Cetrorelix-Acetat in DMSO-d_6	138
Abb. 64:	Ergebnis der NOE-basierten 3D-Strukturbestimmung von Cetrorelix-Acetat in DMSO-d_6 ; links: gemittelte, finale Rückgratstruktur; rechts: finales Strukturbündel.....	139
Abb. 65:	Verteilung der NOE restraints der 3D-Strukturberechnung von Cetrorelix-Acetat in DMSO-d_6 auf die einzelnen Aminosäure-Reste des Peptides.....	141
Abb. 66:	NOE-Kontaktübersicht für die 3D-Strukturberechnung von Cetrorelix-Acetat in DMSO-d_6	141
Abb. 67:	Detailansicht der berechneten 3D-Struktur von Cetrorelix-Acetat in DMSO-d_6 zur Veranschaulichung der Wechselwirkung zwischen dem amidierten Aminosäure-Rest D-Ala-NH ₂ ¹⁰ am C-Terminus des Peptides und dem Peptidrückgrat im Bereich von Tyr ⁵ und D-Cit ⁶ ; Peptidrückgrat im Bereich der resultierenden Schleife violett dargestellt und ausgebildete Wasserstoffbrücken grün.....	142
Abb. 68:	Detailansicht der berechneten 3D-Struktur von Cetrorelix-Acetat in DMSO-d_6 zur Veranschaulichung der Wechselwirkung zwischen D-Pal(3) ³ und D-Cit ⁶ (beide Reste rot hervorgehoben).....	143
Abb. 69:	Ergebnis der NOE-basierten 3D-Strukturbestimmung von Cetrorelix-Acetat in $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$ im Verhältnis 70/30 (v/v) ; links: gemittelte, finale Rückgratstruktur; rechts: finales Strukturbündel.....	144
Abb. 70:	Verteilung der NOE restraints der 3D-Strukturberechnung von Cetrorelix-Acetat in $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$ (70/30 (v/v)) auf die einzelnen Aminosäure-Reste des Peptides.....	145
Abb. 71:	NOE-Kontaktübersicht für die 3D-Strukturberechnung von Cetrorelix-Acetat in $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$ im Verhältnis 70/30 (v/v).....	146
Abb. 72:	Detailansicht der berechneten 3D-Struktur von Cetrorelix-Acetat in $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$ im Verhältnis 70/30 (v/v) zur Veranschaulichung des Interaktionsnetzes von Ac-D-Nal(2) ¹ in einer aus den rot bzw. violett dargestellten Aminosäure-Resten gebildeten, konkaven Tasche.....	146

Abb. 73:	Ergebnis der NOE-basierten 3D-Strukturbestimmung von Cetrorelix-Acetat in DMSO-d ₆ /D ₂ O im Verhältnis 45/55 (v/v) ; links: gemittelte, finale Rückgratstruktur; rechts: finales Strukturbündel.....	147
Abb. 74:	Detailansichten zur Verdeutlichung der gestreckten Konformation des Peptid-Rückgrates von Cetrorelix-Acetat in DMSO-d ₆ /D ₂ O (45/55 (v/v)); links: interagierende Aminosäure-Reste; rechts: Verlauf des Peptidrückgrates (violett hervorgehoben)	148
Abb. 75:	Ergebnis der NOE-basierten 3D-Strukturbestimmung von Ozarelix-Acetat in DMSO-d ₆ ; links: Rückgratstruktur bei <i>trans</i> -konfigurierter Peptidbindung zwischen Ser ⁴ & Tyr(Me) ⁵ ; rechts: Rückgratstruktur bei <i>cis</i> -konfigurierter Peptidbindung zwischen Ser ⁴ & Tyr(Me) ⁵	149
Abb. 76:	Detailansichten zur Verdeutlichung der heilkalen Konformation des Peptid-Rückgrates von Ozarelix-Acetat in DMSO-d ₆ bei einer <i>trans</i> -Peptidbindung zwischen Ser ⁴ und Tyr(Me) ⁵ ; links: Interaktion des phenolischen Ringes von Tyr(Me) ⁵ und der Seitenkette von Nle ⁷ mit Ac-D-Nal(2) ¹ ; rechts: Verlauf des Peptidrückgrates (violett hervorgehoben).....	151
Abb. 77:	Detailansichten zur Verdeutlichung der gestreckten Konformation des Peptid-Rückgrates von Ozarelix-Acetat in DMSO-d ₆ bei einer <i>cis</i> -Peptidbindung zwischen Ser ⁴ und Tyr(Me) ⁵ ; links: hydrophobe Interaktion des phenolischen Ringes von Tyr(Me) ⁵ und der Seitenkette von Nle ⁷ miteinander; rechts: Verlauf des Peptidrückgrates (violett hervorgehoben)	151
Abb. 78:	Ergebnis der NOE-basierten 3D-Strukturbestimmung von Teverelix-Salzen in DMSO-d ₆ ; links: Rückgratstruktur im Fall von Teverelix-Trifluoracetat; rechts: Rückgratstruktur im Fall von Teverelix-Acetat.....	152
Abb. 79:	Detailansichten zur Verdeutlichung der helikalen Konformation des Peptid-Rückgrates von Teverelix-Trifluoracetat in DMSO-d ₆ ; links: paarweise Interaktion der gleichfarbig gekennzeichneten Aminosäure-Reste; rechts: Verlauf des Peptidrückgrates (violett hervorgehoben).....	154
Abb. 80:	Detailansichten zur Verdeutlichung der gestreckten Konformation des Peptid-Rückgrates von Teverelix-Acetat in DMSO-d ₆ ; links: Interaktionen bestimmter Aminosäure-Reste; rechts: Verlauf des Peptidrückgrates (violett hervorgehoben)	154
Abb. 81:	Veränderung des mittels ¹ H-DOSY bestimmten Diffusionskoeffizienten von Cetrorelix-Acetat in Abhängigkeit vom DMSO-d ₆ -Gehalt des NMR-Lösungsmittelgemisches	155
Abb. 82:	Vergleich der ATR-FTIR-Spektren des GHRH-Analogons im deaggregierten (oben) und im aggregierten Zustand (unten)	156
Abb. 83:	Bandenformanalyse der Amid I-Bande des deaggregierten GHRH-Analogons (pH 3,0); links: Gegenüberstellung von experimentell bestimmter und berechneter Amid I-Bande; rechts: Darstellung der einzelnen sekundärstrukturspezifischen Gaußfunktionen.....	157

Abb. 84:	Bandenformanalyse der Amid I-Bande des aggregierten GHRH-Analogons (pH 9,0); links: Gegenüberstellung von experimentell bestimmter und berechneter Amid I-Bande; rechts: Darstellung der einzelnen sekundärstrukturspezifischen Gaußfunktionen	157
Abb. 85:	Bandenformanalyse der Amid I-Bande des GHRH-Analogons direkt aus der Peptidsynthese (pH < 2,0); links: Gegenüberstellung von experimentell bestimmter und berechneter Amid I-Bande; rechts: Darstellung der einzelnen sekundärstrukturspezifischen Gaußfunktionen	158
Abb. 86:	Gegenüberstellung der quantitativen Zusammensetzung des GHRH-Analogons bezüglich der einzelnen Sekundärstrukturelemente in Abhängigkeit vom Aggregationszustand bei unterschiedlichen pH-Werten.....	159
Abb. 87:	pH-abhängige Veränderung des ATR-FTIR-Spektrums des GHRH-Analogons im Bereich der Amid-Banden nach einstündiger Inkubation	160
Abb. 88:	Sekundärstrukturverteilung von Proben des GHRH-Analogons in Abhängigkeit vom pH-Wert während der Inkubation und von der Inkubationsdauer.....	160
Abb. 89:	Anregungs- und Fluoreszenz-Emissionsspektrum des GHRH-Analogons bei einer Peptidkonzentration von 70 µg/ml in Reinstwasser mit 0,1 Vol.-% DMSO	161
Abb. 90:	Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenz-Emission des GHRH-Analogons in Gegenwart bzw. Abwesenheit von 10 Vol.-% Propylenglykol in zwei unterschiedlichen Peptid-Konzentrationsbereichen	162
Abb. 91:	Abhängigkeit der Fluoreszenz-Emission des GHRH-Analogons vom NaCl-Gehalt (links) und vom pH-Wert im Vergleich zum Verhalten von Tyrosin (rechts; Konzentrationsangaben beziehen sich im Fall des GHRH-Analogons auf die enthaltenen tyrosinartigen Reste).....	162
Abb. 92:	Fluoreszenz-Emission von ThioT (links) und amyloid-sensitiver Absorptionsquotient von Kongorot (rechts) in Abhängigkeit von der Konzentration des GHRH-Analogons in Gegenwart von Propylenglykol und Natriumchlorid	164
Abb. 93:	UV/vis-Spektren von Kongorot in Gegenwart einer Konzentrationsreihe des GHRH-analogons bei einem Natriumchlorid-Gehalt von 0,9 %	164
Abb. 94:	Charakteristische Emission der Sonde ThioT in Gegenwart von amyloiden β-Faltblatt-Strukturen des GHRH-Analogons in Abhängigkeit von der Präsenz bestimmter Additive nach 3 d Inkubation bei pH 7,0 und einem Natriumchlorid-Gehalt von 0,9 %	165
Abb. 95:	Charakteristischer Absorptionsquotient der Sonde Kongorot in Gegenwart von amyloiden β-Faltblatt-Strukturen des GHRH-Analogons in Abhängigkeit von der Präsenz bestimmter Additive nach 1 h Inkubation bei pH 7,0 und einem Natriumchlorid-Gehalt von 0,9 %	166

Abb. 96:	Charakteristischer Absorptionsquotient von Kongorot in Gegenwart amyloider Strukturen für GHRH-Analagon-Proben, inkubiert für 1 h bzw. 3 d bei pH 7,0 und einem Natriumchlorid-Gehalt von 0,9 %	167
Abb. 97:	Charakteristische Emission der Sonde ANS in Gegenwart von hydrophoben Clustern des GHRH-Analogons in Abhängigkeit von der Präsenz bestimmter Additive nach 3 d Inkubation bei pH 7,0 und einem Natriumchlorid-Gehalt von 0,9 %	168
Abb. 98:	Fluoreszenzemission der Sonde ThioT (links) bzw. ANS (rechts) für Konzentrationsreihen des GHRH-Analogons in Gegenwart von 10 mM Zitronensäure, 1 % Benzylalkohol und einer Mischung aus 100 µM Embonsäure und 1 % Benzylalkohol nach 3 d Inkubation	169
Abb. 99:	Fluoreszenz-Emissionsspektren der Sonde ANS in GHRH-Analagon-Proben in Gegenwart von L-Ascorbinsäure, Benzylalkohol bzw. einer Mischung aus Benzylalkohol und Embonsäure bei Peptidgehalten von 0,1 mg/ml in den erstgenannten zwei Fällen bzw. bei 0,01 mg/ml für das Mischsystem	170
Abb. 100:	Charakteristischer Absorptionsquotient der Sonde Kongorot für Konzentrationsreihen des GHRH-Analogons in Gegenwart von 10 mM Zitronensäure, 1 % Benzylalkohol und einer Mischung aus 100 µM Embonsäure und 1 % Benzylalkohol nach 3 d Inkubation; links: Verhalten nach 3 d Inkubation; rechts: Zeitabhängigkeit zwischen 1 h und 3 d	171
Abb. 101:	Fluoreszenzemission der Sonde ThioT (links) bzw. ANS (rechts) für Konzentrationsreihen des GHRH-Analogons in Gegenwart unterschiedlich konzentrierter Gluconsäure-Lösungen nach 1 h bzw. 3 d Inkubation bei pH 7,0 und einem Natriumchlorid-Gehalt von 0,9 %	171
Abb. 102:	Zeitabhängiges Verhalten des charakteristischen Absorptionsquotienten von Kongorot in Gegenwart amyloider Strukturen in Konzentrationsreihen des GHRH-Analogons in Anwesenheit verschieden konzentrierter Gluconsäure-Lösungen	172
Abb. 103:	Acetat-Effekt: Fluoreszenzemission der Sonde ThioT (links) bzw. ANS (rechts) für Konzentrationsreihen des GHRH-Analogons in Gegenwart der im Text genannten Additive nach 1 h Inkubation bei pH 7,0 und einem Natriumchlorid-Gehalt von 0,9 %	173
Abb. 104:	Trifluoracetat-Effekt: Fluoreszenzemission der Sonde ThioT (links) bzw. ANS (rechts) für Konzentrationsreihen des GHRH-Analogons in Gegenwart der im Text genannten Additive nach 1 h Inkubation bei pH 7,0 und einem Natriumchlorid-Gehalt von 0,9 %	174
Abb. 105:	Hydrochlorid-Effekt: Fluoreszenzemission der Sonde ThioT (links) bzw. ANS (rechts) für Konzentrationsreihen des GHRH-Analogons in Gegenwart der im Text genannten Additive nach 1 h Inkubation bei pH 7,0 und einem Natriumchlorid-Gehalt von 0,9 %	174
Abb. 106:	TEM-Aufnahmen einer GHRH-Analagon-Probe nach Neutralisierung und Anhebung des Natriumchlorid-Gehaltes auf 0,9 % (Probe gemäß Abschnitt 3.9.1 vor der Messung 1:25 (v:v) verdünnt;	

	Maßstab jeweils der Graphik zu entnehmen); "Length" entspricht jeweilig bestimmter Fibrillendicke.....	175
Abb. 107:	TEM-Aufnahmen des GHRH-Analogons in Gegenwart von 25 mM L-Ascorbinsäure; links: nach 2 h Inkubation bei pH 7,0 und 0,9 % Natriumchlorid-Gehalt (TEM); rechts: nach 1 Woche Inkubation bei pH 7,0 und 0,9 % Natriumchlorid-Gehalt (Kryo-TEM); (Proben jeweils 1:25 (v:v) vor der Messung verdünnt).....	176
Abb. 108:	TEM-Aufnahmen des GHRH-Analogons in Gegenwart von 100 µM Embonsäure und 1 % Benzylalkohol; links: nach 2 h Inkubation bei pH 7,0 und 0,9 % Natriumchlorid-Gehalt (TEM); rechts: nach 1 Woche Inkubation bei pH 7,0 und 0,9 % Natriumchlorid-Gehalt (Kryo-TEM); (Proben jeweils 1:25 (v:v) vor der Messung verdünnt).....	177
Abb. 109:	Gemittelte Struktur des Peptidrückgrates (links) und Detailansicht der Kontaktregion für die Schleifenbildung (rechts) des GHRH-Analogons nach Peptidsyntheseverfahren 1 in DMSO-d ₆	179
Abb. 110:	Gemittelte Struktur des Peptidrückgrates für Strukturvariante 1 (links) und Strukturvariante 2 (rechts) des GHRH-Analogons nach Peptidsynthesevariante 2 in DMSO-d ₆	179
Abb. 111:	Detailansicht der Kontaktregion für die Schleifenbildung im Fall der beobachteten Strukturvariante 2 des GHRH-Analogons nach Peptidsyntheseverfahren 2 in DMSO-d ₆	180
Abb. 112:	Chromatogramm der optimierten Stufentrennung der Gallotanninmischung aus <i>Rhus chinensis</i> an Sephadex LH-20; vereinigte Fraktionen farblich gekennzeichnet und mit der im Folgenden verwendeten Bezeichnung der Tanninfraktionen TaF1 - TaF4 beschriftet	182
Abb. 113:	Analytische HPLC-Chromatogramme der einzelnen Fraktionen aus der Stufentrennung der Gallotanninmischung aus <i>Rhus chinensis</i> an Sephadex LH-20; HPLC-Parameter gemäß Abschnitt 3.15 Programm für Methanalyseprodukte).....	183
Abb. 114:	TIC- und ausgewählte XIC-Chromatogramme der Tanninfraktion TaF1	184
Abb. 115:	TIC- und ausgewählte XIC-Chromatogramme der Tanninfraktion TaF2	185
Abb. 116:	UV-Spur und ausgewählte XIC-Chromatogramme der Tanninfraktion TaF3 für Masse/Ladungsverhältnisse < 1000	185
Abb. 117:	UV-Spur und ausgewählte XIC-Chromatogramme der Tanninfraktion TaF3 für Masse/Ladungsverhältnisse > 1000	186
Abb. 118:	UV-Spur und ausgewählte XIC-Chromatogramme der Tanninfraktion TaF4 für Masse/Ladungsverhältnisse < 1000	187
Abb. 119:	UV-Spur und ausgewählte XIC-Chromatogramme der Tanninfraktion TaF4 für Masse/Ladungsverhältnisse > 1000	187
Abb. 120:	Semi-präparatives HPLC-Chromatogramm der Tanninfraktion TaF1, sowie Rechromatogramme der gewonnenen Teilfraktionen TaF1_Peak1 und TaF1_Peak2.....	188

Abb. 121:	Semi-präparatives HPLC-Chromatogramm der Tanninfraktion TaF2, sowie Rechromatogramme der gewonnenen Teilfraktionen TaF2_Peak1, TaF2_Peak2 und TaF2_Peak3.....	189
Abb. 122:	Semi-präparatives HPLC-Chromatogramm der Tanninfraktion TaF3, sowie Rechromatogramme der Teilfraktionen TaF3_Peak1, TaF3_Peak2 und TaF3_Peak3	190
Abb. 123:	Semi-präparatives HPLC-Chromatogramm der Tanninfraktion TaF4, sowie Rechromatogramme der gewonnenen Teilfraktionen TaF4_Peak1, TaF4_Peak2 und TaF4_Peak3.....	190
Abb. 124:	UV-Spur und XIC-Chromatogramme der methanolytisch gewonnenen Galloylglukosen nach einer Reaktionszeit von 6 h (Chromatogramme normiert)	191
Abb. 125:	UV-Spur und XIC-Chromatogramme der übrigen bei der Methanolyse entstehenden Verbindungen nach einer Reaktionszeit von 6 h (Chromatogramme normiert).....	192
Abb. 126:	Massenspektrum des Tochterionen-Scans der Verbindung mit einem Masse/Ladungs-verhältnis von 680 aus der Methanolyse	193
Abb. 127:	UV-Spuren und ausgewählte XIC-Chromatogramme der <i>n</i> -Propanolyse, Ethanolyse und Methanolyse der Gallotanninmischung aus <i>Rhus chinensis</i>	194
Abb. 128:	Semi-präparative HPLC-Chromatogramme der Reaktionsmischung nach 24 h Methanolyse der Gallotanninmischung, sowie der einzelnen Phasen der anschließenden Diethylether-extraktion	195
Abb. 129:	Semi-präparative Chromatogramme der wässrigen Phase der Diethyletherextraktion, sowie der einzelnen Phasen der daran anschließenden Essigsäureethylester-Extraktion.....	196
Abb. 130:	Überstand vor und nach der Kristallisation von PGG	196
Abb. 131:	Semi-präparative HPLC-Chromatogramme und Rechromatogramme der Isolierung der finalen Tanninfraktionen 3GG, 4GG und PGG aus dem Überstand der PGG-Kristallisation.....	197
Abb. 132:	Semi-präparative HPLC-Chromatogramme und Rechromatogramme der Isolierung von PGG durch Umkristallisieren und semi-präparative HPLC	198
Abb. 133:	$^1\text{H}/^1\text{H}$ -COSY der Trigalloylglukose 3GG in DMSO- d_6 im Bereich der Glukose-Signale; skalare Kopplungen entlang des Glukoseringes durch Pfeile gekennzeichnet	199
Abb. 134:	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum von 3GG in DMSO- d_6 samt Signalzuordnung.....	201
Abb. 135:	^1H -NMR-Spektren der Tanninspezies 3GG, 4GG und PGG im Bereich der aromatischen und phenolischen Signale mit der korrespondierenden Strukturformel der Verbindung	202
Abb. 136:	Analytische HPLC-Chromatogramme ausgewählter Standards (links) und Kalibriergerade (rechts) für die Trigalloylglukose (3GG).....	204

Abb. 137:	Analytische HPLC-Chromatogramme ausgewählter Standards (links) und Kalibriergerade (rechts) für die Tetragalloylglukose (4GG).....	204
Abb. 138:	Analytische HPLC-Chromatogramme ausgewählter Standards (links) und Kalibriergerade (rechts) für 1,2,3,4,6-Pentagalloylglukose (PGG).....	205
Abb. 139:	ATR-FTIR-Spektren der drei finalen Tanninspezies 3GG, 4GG und PGG (Spektren sind basislinien-korrigiert und normiert)	206
Abb. 140:	Auftragung verschiedener Bandenflächenquotienten gegen die Anzahl der in der jeweiligen Tanninspezies enthaltenen Galloyleinheiten	206
Abb. 141:	Präzipitation von 3GG, 4GG und PGG in Reinstwasser nach 48 h Inkubation bei Raumtemperatur	207
Abb. 142:	Erstarrung von 1,2,3,4,6-O-Pentagalloylglukose (PGG) (5 mg/ml) in Gegenwart von Gallussäure in Abhängigkeit von der Temperatur.....	208
Abb. 143:	Erstarrung von 1,2,3,4,6-Pentagalloylglukose (PGG) (5 mg/ml) in Gegenwart von Methylgallat in Abhängigkeit von der Temperatur [verändert aus Körner, 2015]	209
Abb. 144:	ATR-FTIR-Spektren von Cetrorelix-Chitosan-Komplexen bei variiertter Zusammensetzung beider Komponenten im Ansatz nach Fällung aus essigsaurer Lösung durch Neutralisation; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3	210
Abb. 145:	ATR-FTIR-Spektren von Cetrorelix-Dextran-Komplexen bei variiertter Zusammensetzung beider Komponenten im Ansatz nach Fällung aus essigsaurer Lösung durch Neutralisation; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3	211
Abb. 146:	ATR-FTIR-Spektren von Cetrorelix-Stärke-Komplexen bei variiertter Zusammensetzung beider Komponenten im Ansatz nach Fällung aus essigsaurer Lösung durch Neutralisation; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3	212
Abb. 147:	ATR-FTIR-Spektren von Cetrorelix-Amylose-Komplexen bei variiertter Zusammensetzung beider Komponenten im Ansatz nach Fällung aus essigsaurer Lösung durch Neutralisation; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3	212
Abb. 148:	Vergleichende Gegenüberstellung der ATR-FTIR-Spektren von reiner Amylose und einem Cetrorelix-Amylose-Komplex; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3	213
Abb. 149:	Vergleichende Gegenüberstellung der ATR-FTIR-Spektren von Cetrorelix-Acetat und einem Cetrorelix-Amylose-Komplex, welche bei pH 3,0 präzipitiert bzw. lyophilisiert wurden; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3	214
Abb. 150:	ATR-FTIR-Spektren von Cetrorelix-Komplexen mit der ungetrennten Gallotanninmischung aus <i>Rhus chinensis</i> (in der Abbildung "Tannin" genannt) in Abhängigkeit von den	

	Präparationsbedingungen; Abschnitt 3.4.3	Komplexpräparation	siehe
			215
Abb. 151:	Vergleichende Gegenüberstellung der ATR-FTIR-Spektren des Cetorelix-Anteils aus dem Cetorelix-Tannin-Komplex, der nach einer Interaktionsphase bei pH 3,0 resultiert, und der Spektren von ungeordnetem sowie amyloid-aggregiertem Cetorelix; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3.....		216
Abb. 152:	ATR-FTIR-Spektren von Dreikomponenten-Komplexen aus Cetorelix, der Gallotannin-mischung und Poly-L-Glutamat in Abhängigkeit von der Präparation der Komplexe; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3.....		217
Abb. 153:	ATR-FTIR-Spektren von Cetorelix-Komplexen mit Tanninfraktion TaF1 und deren Teilfraktionen; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3.....		218
Abb. 154:	ATR-FTIR-Spektren von Ozarelix-Komplexen mit Tanninfraktion TaF1 und deren Teilfraktionen; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3.....		218
Abb. 155:	ATR-FTIR-Spektren von Cetorelix-Komplexen mit Tanninfraktion TaF2 und deren Teilfraktionen; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3.....		219
Abb. 156:	ATR-FTIR-Spektren von Ozarelix-Komplexen mit Tanninfraktion TaF2 und deren Teilfraktionen; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3.....		220
Abb. 157:	ATR-FTIR-Spektren von Cetorelix-Komplexen mit Tanninfraktion TaF3 und deren Teilfraktionen; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3.....		221
Abb. 158:	ATR-FTIR-Spektren von Ozarelix-Komplexen mit Tanninfraktion TaF3 und deren Teilfraktionen; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3.....		221
Abb. 159:	ATR-FTIR-Spektren von Cetorelix-Komplexen mit Tanninfraktion TaF4 und deren Teilfraktionen; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3.....		222
Abb. 160:	ATR-FTIR-Spektren von Ozarelix-Komplexen mit Tanninfraktion TaF4 und deren Teilfraktionen; Komplexpräparation siehe Abschnitt 3.4.3.....		222
Abb. 161:	Quantifizierung der pH-abhängig präzipitierten Cetorelix-Menge in Gegenwart von Amylose (links) und Stabilität der resultierenden Komplexe gegenüber einem Waschschrift mit Reinstwasser (rechts); vgl. Abschnitt 3.17.3		223
Abb. 162:	ph-Abhängigkeit der spezifischen Viskosität von Amylose, <i>lmw</i> Chitosan und Cetorelix bei einer jeweiligen Konzentration von 1 mg/ml.....		224
Abb. 163:	ATR-FTIR-Spektren von löslicher Stärke und nach unterschiedlichen Verfahren getrockneter Amylose; Präparation siehe Abschnitt 3.4.2 und 3.4.3		225

Abb. 164:	Zeitabhängige Serie von ATR-FTIR-Spektren des Amylopektingels nach der präparativen Isolierung aus Kartoffelstärke; siehe Abschnitt 3.4.2.....	226
Abb. 165:	Konzentrationsabhängige Fluoreszenzemissionsverläufe von Cetorelix-Proben bei verschiedenen pH-Werten und Inkubationszeiten in 0,1 M Ammoniumacetat-Lösung.....	227
Abb. 166:	Konzentrationsabhängige Fluoreszenzemissionsverläufe von Cetorelix-Proben bei pH 4,0 nach eintägiger Inkubation in Gegenwart von Amylose bzw. Amylopektin.....	228
Abb. 167:	Kongorottitration von Proben des amyloid aggregierten GnRH-Antagonisten Cetorelix (links) und des nicht amyloid aggregierenden Proteins Ovalbumin (rechts) in Abhängigkeit von der vorgelegten Menge des jeweiligen Analyten samt Extrapolationsgeraden zur Nullstellenbestimmung	230
Abb. 168:	Kongorotbindungsplatzverlust in Cetorelix-Poly-L-Glutamat-Komplexen in Korrelation zum Massenverhältnis zwischen Poly-L-Glutamat und Cetorelix im Präparationsansatz	232
Abb. 169:	Kongorotbindungsplatzverlust in Cetorelix-Komplexen mit der ungetrennten Gallotanninmischung aus <i>Rhus chinensis</i> in Korrelation zum Massenverhältnis zwischen Partnermolekül und Cetorelix für zwei unterschiedliche Präparationsvarianten	233
Abb. 170:	Maximal ermittelter Kongorotbindungsplatzverlust für Cetorelix-Komplexe mit der Gallotanninmischung und Poly-L-Glutamat in Abhängigkeit von der Präparationsvariante.....	234
Abb. 171:	Kongorottitrationskurven für Cetorelix-Komplexe mit Tanninfraktion TaF1 und deren Teilfraktionen (links) sowie mit Tanninfraktion TaF2 und deren Teilfraktionen (rechts).....	235
Abb. 172:	Kongorottitrationskurven für Cetorelix-Komplexe mit Tanninfraktion TaF3 und deren Teilfraktionen (links) sowie mit Tanninfraktion TaF4 und deren Teilfraktionen (rechts).....	236
Abb. 173:	Kongorottitrationskurven für Ozarelix-Komplexe mit Tanninfraktion TaF1 und deren Teilfraktionen (links) sowie mit Tanninfraktion TaF2 und deren Teilfraktionen (rechts).....	237
Abb. 174:	Kongorottitrationskurven für Ozarelix-Komplexe mit Tanninfraktion TaF3 und deren Teilfraktionen (links) sowie mit Tanninfraktion TaF4 und deren Teilfraktionen (rechts).....	237
Abb. 175:	Kongorottitrationskurven für Teverelix-Komplexe mit Tanninfraktion TaF1 und deren Teilfraktionen (links) sowie mit Tanninfraktion TaF2 und deren Teilfraktionen (rechts).....	238
Abb. 176:	Kongorottitrationskurven für Teverelix-Komplexe mit Tanninfraktion TaF3 und deren Teilfraktionen (links) sowie mit Tanninfraktion TaF4 und deren Teilfraktionen (rechts).....	238
Abb. 177:	Kongorottitrationskurven für Cetorelix-Komplexe (links) bzw. Teverelix-Komplexe (rechts) mit den finalen Tanninspezies 3GG,	

	4GG und PGG aus der Methanolyse der Gallotannin-mischung aus <i>Rhus chinensis</i>	239
Abb. 178:	Kongorottrationskurven für Ozarelix-Komplexe mit den finalen Tanninspezies 3GG, 4GG und PGG aus der Methanolyse der Gallotanninmischung aus <i>Rhus chinensis</i>	240
Abb. 179:	LC-MS-Chromatogramme der Hauptkomponenten von Tanninfraktion TaF1 nach Interaktion mit Cetorelix (oben) bzw. in einer peptidfreien Referenz (unten).....	241
Abb. 180:	LC-MS-Chromatogramme der Hauptkomponenten von Tanninfraktion TaF2 nach Interaktion mit Cetorelix (oben) bzw. in einer peptidfreien Referenz (unten).....	241
Abb. 181:	Relative Zusammensetzung der Tanninspezies im Komplex mit Cetorelix in Abhängigkeit vom Massenverhältnis beider Komponenten im Ansatz; auf der linken Seite der roten Trennlinie sind zum Vergleich die Zusammensetzung der eingesetzten Methanolyseprodukt-mischung (M*) mit und ohne Berücksichtigung von Methylgallat angegeben	242
Abb. 182:	Dialyseliberationskurven für Tyrosinlösungen variiertter Konzentration bei pH 3,0 über einen Gesamtzeitraum von 7 Tagen (Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen)	244
Abb. 183:	Dialyseliberationskurven für Tyrosinlösungen bei pH 3,0 in Gegenwart von 1 mg/ml <i>lmw</i> Chitosan über einen Gesamtzeitraum von 7 Tagen (Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen)	245
Abb. 184:	Dialyseliberationskurven für Cetorelix-Lösungen in Abhängigkeit vom pH-Wert über einen Gesamtzeitraum von 28 Tagen (Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen)	246
Abb. 185:	Dialyseliberationskurven für Cetorelix-Formulierungen mit <i>lmw</i> Chitosan in Abhängigkeit vom pH-Wert über einen Gesamtzeitraum von 28 Tagen (Massenverhältnis von Partnermolekül zu Cetorelix 1 : 1; Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen).....	248
Abb. 186:	Dialyseliberationskurven für Cetorelix-Formulierungen mit <i>lmw</i> Chitosan variablen N-Acetylierungsgrades bei pH 3,0 über einen Gesamtzeitraum von 28 Tagen (Massenverhältnis von Partnermolekül zu Cetorelix 1 : 1).....	249
Abb. 187:	Dialyseliberationskurven für Cetorelix-Formulierungen mit <i>lmw</i> Chitosan variablen N-Acetylierungsgrades bei pH 5,0 (links) und pH 7,0 (rechts) über einen Gesamtzeitraum von 28 Tagen (Massenverhältnis von Partnermolekül zu Cetorelix 1 : 1)	249
Abb. 188:	Dialyseliberationskurven für Cetorelix-Formulierungen mit löslicher Stärke, Amylose bzw. Amylopektin bei pH 3,0 über einen Gesamtzeitraum von 28 Tagen (Massenverhältnis von Partnermolekül zu Cetorelix 1 : 1; Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen)	250
Abb. 189:	Dialyseliberationskurven für Cetorelix-Formulierungen mit löslicher Stärke, Amylose bzw. Amylopektin bei pH 4,0 über einen Gesamtzeitraum von 28 Tagen (Massenverhältnis von	

	Partnermolekül zu Cetorelix 1 : 1; Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen).....	251
Abb. 190:	Dialyseliberationskurven von Cetorelix-Formulierungen mit Alginat (links) bzw. Hyaluronat (rechts) bei pH 3,0 über einen Gesamtzeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexpartner im Ansatz).....	252
Abb. 191:	Dialyseliberationskurven von Cetorelix-Formulierungen mit Alginat (links) bzw. Hyaluronat (rechts) bei pH 5,0 über einen Gesamtzeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexpartner im Ansatz).....	253
Abb. 192:	Dialyseliberationskurven von Cetorelix-Formulierungen mit Alginat (links) bzw. Hyaluronat (rechts) bei pH 7,0 über einen Gesamtzeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexpartner im Ansatz).....	253
Abb. 193:	Dialyseliberationskurven von Cetorelix-Referenzen und Cetorelix-Komplexen mit der ungetrennten Gallotanninmischung aus <i>Rhus chinensis</i> ohne Zugabe von NaCl (links) bzw. in Gegenwart von 0,9 % NaCl (rechts) in Abhängigkeit vom pH-Wert über 28 Tage; Kurve für Cetorelix-Referenz bei pH 7,0 fehlt rechts aufgrund technischer Probleme	255
Abb. 194:	Dialyseliberationskurven von Cetorelix- (links) bzw. Teverelix-Formulierungen (rechts) mit der Trigalloylglukose 3GG bei pH 3,0 über einen Zeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexpartner im Ansatz)	256
Abb. 195:	Dialyseliberationskurven von Cetorelix- (links) bzw. Teverelix-Formulierungen (rechts) mit der Tetragalloylglukose 4GG bei pH 3,0 über einen Zeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexpartner im Ansatz)	257
Abb. 196:	Dialyseliberationskurven von Cetorelix- (links) bzw. Teverelix-Formulierungen (rechts) mit der Pentagalloylglukose PGG bei pH 3,0 über einen Zeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexpartner im Ansatz)	257
Abb. 197:	Dialyseliberationskurven von Ozarelix-Formulierungen mit der Trigalloylglukose 3GG (links) bzw. der Pentagalloylglukose PGG (rechts) bei pH 3,0 über einen Zeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexpartner im Ansatz)	258
Abb. 198:	HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von 3GG ohne GnRH-Antagonisten bei pH 3,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Liberationsgefäß zu verschiedenen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Liberationsgefäß nach Ende des Experimentes	259

Abb. 199:	HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von 3GG in Komplexen mit Cetrorelix bei pH 3,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Libervationsgefäß zu unterschiedlichen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Libervationsgefäß nach Ende des Experimentes.....	259
Abb. 200:	HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von 4GG ohne GnRH-Antagonisten bei pH 3,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Libervationsgefäß zu verschiedenen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Libervationsgefäß nach Ende des Experimentes.....	260
Abb. 201:	HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von 4GG in Komplexen mit Teverelix bei pH 3,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Libervationsgefäß zu unterschiedlichen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Libervationsgefäß nach Ende des Experimentes.....	261
Abb. 202:	HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von PGG ohne GnRH-Antagonisten bei pH 3,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Libervationsgefäß zu verschiedenen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Libervationsgefäß nach Ende des Experimentes.....	262
Abb. 203:	HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von PGG in Komplexen mit Ozarelix bei pH 3,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Libervationsgefäß zu unterschiedlichen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Libervationsgefäß nach Ende des Experimentes.....	262
Abb. 204:	Dialyseliberationskurven von Cetrorelix- (links) bzw. Teverelix-Formulierungen (rechts) mit der Pentagalloylglukose PGG bei pH 5,0 über einen Zeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexpartner im Ansatz).....	263
Abb. 205:	HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von PGG ohne GnRH-Antagonisten bei pH 5,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Libervationsgefäß zu verschiedenen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Libervationsgefäß nach Ende des Experimentes.....	264
Abb. 206:	HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von PGG in Komplexen mit Teverelix bei pH 5,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Libervationsgefäß zu unterschiedlichen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Libervationsgefäß nach Ende des Experimentes.....	264

Abb. 207:	Dialyseliberationskurven von Teverelix- (links) bzw. Ozarelix-Formulierungen (rechts) mit der Tetragalloylglukose 4GG bei pH 7,0 über einen Zeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexpartner im Ansatz)	265
Abb. 208:	HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von 4GG ohne GnRH-Antagonisten bei pH 7,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Liberationsgefäß zu verschiedenen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Liberationsgefäß nach Ende des Experimentes	266
Abb. 209:	Dialyseliberationskurven von Teverelix- (links) bzw. Ozarelix-Formulierungen (rechts) mit der Teilfraktion TaF3-Peak2 bei pH 3,0 über einen Zeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexpartner im Ansatz)	267
Abb. 210:	HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von TaF3-Peak2 bei pH 3,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Liberationsgefäß zu verschiedenen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Liberationsgefäß nach Ende des Experimentes	268
Abb. 211:	HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von TaF3-Peak2 aus Komplexen mit Ozarelix bei pH 3,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Liberationsgefäß zu verschiedenen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Liberationsgefäß nach Ende des Experimentes	268
Abb. 212:	Dialyseliberationskurven von Teverelix- (links) bzw. Ozarelix-Formulierungen (rechts) mit der Teilfraktion TaF3-Peak2 bei pH 5,0 über einen Zeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexpartner im Ansatz)	269
Abb. 213:	HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von TaF3-Peak2 bei pH 5,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Liberationsgefäß zu verschiedenen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Liberationsgefäß nach Ende des Experimentes	270
Abb. 214:	HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von TaF3-Peak2 aus Komplexen mit Ozarelix bei pH 5,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Liberationsgefäß zu verschiedenen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Liberationsgefäß nach Ende des Experimentes	270
Abb. 215:	Dialyseliberationskurven von Teverelix- (links) bzw. Ozarelix-Formulierungen (rechts) mit der Teilfraktion TaF3-Peak2 bei pH 7,0	

	über einen Zeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexpartner im Ansatz).....	271
Abb. 216:	HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von TaF3-Peak2 bei pH 7,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Liberationsgefäß zu verschiedenen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Liberationsgefäß nach Ende des Experimentes	272
Abb. 217:	HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von TaF3-Peak2 aus Komplexen mit Ozarelix bei pH 7,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Liberationsgefäß zu verschiedenen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Liberationsgefäß nach Ende des Experimentes.....	272
Abb. 218:	Dialyseliberationskurven von Cetorelix- (links) bzw. Ozarelix-Formulierungen (rechts) mit der Teilfraktion TaF4-Peak2 bei pH 3,0 über einen Zeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexpartner im Ansatz).....	273
Abb. 219:	Dialyseliberationskurven von Ozarelix-Formulierungen mit der Teilfraktion TaF4-Peak2 bei pH 5,0 (links) bzw. pH 7,0 (rechts) über einen Zeitraum von 28 Tagen (angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Massenverhältnisse der Komplexpartner im Ansatz).....	274
Abb. 220:	Dialyseliberationskurven von Cetorelix-Formulierungen mit nicht-kovalent verbundenen Systemen aus der ungetrennten Gallotanninmischung (links) bzw. 3GG (rechts) und den unterschiedlich stark N-acetylierten Chitosanen 1-3 bei pH 3,0	275
Abb. 221:	Dialyseliberationskurven von Cetorelix-Formulierungen mit nicht-kovalent verbundenen Systemen aus 3GG und den unterschiedlich stark N-acetylierten Chitosanen 1-3 bei pH 5,0 (links) bzw. pH 7,0 (rechts).....	276
Abb. 222:	HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von Komplexen aus nicht-kovalenten Systemen von 3GG mit Chitosan 2 (DA = 29 %) mit Cetorelix bei pH 3,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Liberationsgefäß zu verschiedenen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Liberationsgefäß nach Ende des Experimentes (3GG-Peak bei 19,8 min).....	276
Abb. 223:	Dialyseliberationskurven von Cetorelix-Formulierungen mit TaNSCS 1 in Abhängigkeit vom Massenverhältnis von Partnermolekül zu Peptid bei pH 3,0 (links) bzw. pH 5,0 (rechts)	277
Abb. 224:	Dialyseliberationskurven von Cetorelix-Formulierungen mit TaNSCS 3 in Abhängigkeit vom Massenverhältnis von Partnermolekül zu Peptid bei pH 3,0 (links) bzw. pH 5,0 (rechts)	278

Abb. 225:	Dialyseliberationskurven von Cetorelix-Komplexen mit TaNSCS 2 (links) bzw. TaNSCS 3 (rechts) in Abhängigkeit vom Massenverhältnis von Partnermolekül zu Peptid bei pH 7,0.....	279
Abb. 226:	HPLC-Chromatogramme der zeitabhängigen Dialyseliberation von Komplexen aus Cetorelix und TaNSCS 1 bei pH 3,0; die unteren 4 Chromatogramme stammen von Probenahmen aus dem äußeren Liberationsgefäß zu verschiedenen Zeitpunkten; das darüber dargestellte Chromatogramme stammt aus dem inneren Liberationsgefäß nach Ende des Experimentes (Gallussäure-Peak bei 12,4 min)	279
Abb. 227:	Veranschaulichung der Veränderung der NMR-spektroskopisch ermittelten Monomerkonformation von Cetorelix in Abhängigkeit vom D ₂ O-Anteil; in reinem D ₂ O verhindert die starke Aggregationsneigung eine Analyse, weshalb lediglich eine Extrapolation der zu erwartenden Struktur denkbar ist.....	283
Abb. 228:	Modellvorschlag für die Dimerstruktur von Cetorelix unter Berücksichtigung der IR-spektroskopisch ermittelten Sekundärstrukturverteilung innerhalb des Aggregates (rot: Tyr ⁵ -Seitenketten; blau: Ac-D-Nal(2) ¹ -Seitenketten; grün: β -Faltblattbereiche des Peptidrückgrates; rot-blaue Linien: H-Brückenbindungen).....	288
Abb. 229:	Kompensation der fehlenden, β -Faltblatt-typischen Wasserstoffbrücke im Bereich des Ser ⁴ -Restes durch eine Seitenkettenwechselwirkung (blau-rote Linien: H-Brücken).....	289
Abb. 230:	MALDI-TOF-Massenspektrum einer Mischung aus Cetorelix und seinem Di- <i>Tertbutyl</i> -geschützten Derivat DG-420099 (jeweils c = 0,01 mg/ml in 5 mg/ml DHB-Matrix) [modifiziert nach Hempelt, 2012].....	291
Abb. 231:	Veranschaulichung der durch eine Naphthyl-Naphthyl-Interaktion generierten initialen Wasserstoffbrückenbindung in einem Cetorelix-Dimer aus einer MD-Simulation (Wasserstoffbrückenbindungen violett gekennzeichnet) [nach: Schneider, 2014]	293
Abb. 232:	Modell einer fibrillären Teilstruktur von Cetorelix-Aggregaten unter hydrophober Assoziation mehrerer Dimere und eines Monomers im N-terminalen Bereich (Naphthylsysteme von Ac-D-Nal(2) ¹ orange hervorgehoben) [Schneider, 2014].....	295
Abb. 233:	Strukturvorschlag und Fragmentierungspfade für die während der Methanolyse der Gallotanninmischung aus <i>Rhus chinensis</i> intermediär auftretende Tanninspezies	304
Abb. 234:	Strukturvorschlag und Fragmentierungspfade für die während der Methanolyse der Gallotanninmischung aus <i>Rhus chinensis</i> intermediär auftretende Tanninspezies, basierend auf der von Körner vorgeschlagenen Struktur für eine klassische Ellagitanninstruktur	306

Abb. 235:	Übersicht der erzielten Reduktionen des Amyloidgehaltes von GnRH-Antagonisten für die einzelnen Tanninfraktionen, -teilfraktionen und -spezies bei einem Tannin/Peptid-Massenverhältnis von stets 0,5 : 1	312
Abb. A 1:	Verteilung der NOE restraints der 3D-Strukturberechnung von Cetrorelix-Acetat in DMSO-d₆/D₂O (45/55 (v/v)) auf die einzelnen Aminosäure-Reste des Peptides	391
Abb. A 2:	NOE-Kontaktübersicht für die 3D-Strukturberechnung von Cetrorelix-Acetat in DMSO-d₆/D₂O im Verhältnis 45/55 (v/v)	392
Abb. A 3:	Verteilung der NOE restraints der 3D-Strukturberechnung von Ozarelix-Acetat in DMSO-d₆ bei einer <i>trans</i>-Peptidbindung auf die einzelnen Aminosäure-Reste des Peptides	392
Abb. A 4:	NOE-Kontaktübersicht für die 3D-Strukturberechnung von Ozarelix-Acetat in DMSO-d₆ bei einer <i>trans</i>-Peptidbindung zwischen Ser⁴ und Tyr(Me)⁵	393
Abb. A 5:	Verteilung der NOE restraints der 3D-Strukturberechnung von Ozarelix-Acetat in DMSO-d₆ bei einer <i>cis</i>-Peptidbindung auf die einzelnen Aminosäure-Reste des Peptides	393
Abb. A 6:	NOE-Kontaktübersicht für die 3D-Strukturberechnung von Ozarelix-Acetat in DMSO-d₆ bei einer <i>cis</i>-Peptidbindung zwischen Ser⁴ und Tyr(Me)⁵	394
Abb. A 7:	Verteilung der NOE restraints der 3D-Strukturberechnung von Teverelix-TFA in DMSO-d₆	394
Abb. A 8:	NOE-Kontaktübersicht für die 3D-Strukturberechnung von Teverelix-TFA in DMSO-d₆	395
Abb. A 9:	Verteilung der NOE restraints der Strukturberechnung von Teverelix-Acetat in DMSO-d₆	395
Abb. A 10:	NOE-Kontaktübersicht für die 3D-Strukturberechnung von Teverelix-Acetat in DMSO-d₆	396
Abb. A 11:	ATR-FTIR-Spektren von Teverelix-Komplexen mit Tanninfraktion TaF1 und deren Teilfraktionen.....	398
Abb. A 12:	ATR-FTIR-Spektren von Teverelix-Komplexen mit Tanninfraktion TaF2 und deren Teilfraktionen.....	399
Abb. A 13:	ATR-FTIR-Spektren von Teverelix-Komplexen mit Tanninfraktion TaF3 und deren Teilfraktionen.....	399
Abb. A 14:	ATR-FTIR-Spektren von Teverelix-Komplexen mit Tanninfraktion TaF4 und deren Teilfraktionen.....	400

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Parameter der Bestimmung des Peptidgehaltes in Lösungen von GnRH-Antagonisten mithilfe der isokratischen HPLC-Anlage 1 der Firma Gamma Analysen Technik Jena GmbH	45
Tabelle 2:	Parameter der Bestimmung des Peptidgehaltes in Lösungen von GnRH-Antagonisten mithilfe der isokratischen HPLC-Anlage 1 der Firma Beckman.....	46
Tabelle 3:	Geräte-Parameter der ATR-FTIR-spektroskopischen Untersuchungen	50
Tabelle 4:	Übersicht der empirisch bestimmten Parameter der Gauss-Funktionen zur Beschreibung der Amid I-Teilbanden der einzelnen Sekundärstrukturmerkmale von GnRH-Antagonisten	55
Tabelle 5:	Übersicht der empirisch bestimmten Parameter der Gauss-Funktionen zur Beschreibung der Amid I-Teilbanden der einzelnen Sekundärstrukturmerkmale des GHRH-Analogons.....	56
Tabelle 6:	Parameter der statischen Fluoreszenzspektroskopie an Proben des GHRH-Analogons.....	57
Tabelle 7:	Ansatzbedingungen für den ersten Schritt der Untersuchung von Proben des GHRH-Analogons mithilfe struktursensitiver UV- bzw. Fluoreszenz-Sonden	59
Tabelle 8:	Parameter der UV/VIS-spektroskopischen Untersuchungen von GHRH-Analagon-Lösungen in Gegenwart der struktursensitiven Sonde Kongorot.....	62
Tabelle 9:	Übersicht über die Parameter der Messreihen zur Erfassung von Aggregations-Phasendiagrammen von Cetrorelix und Ozarelix in Ethanol/Wasser-Gemischen	66
Tabelle 10:	Parameter der TCSPC-Untersuchungen an Teverelix-Lösungen in 10 mM Ammoniumacetat-Lösung (pH 7,0) und 0,1 M Essigsäure (pH 3,0)	68
Tabelle 11:	Übersicht untersuchter NMR-Proben und der jeweils aufgenommenen NMR-Spektren.....	71
Tabelle 12:	Einstellungen des zentralen Programms <i>UNIO</i> für die NMR-basierte 3D-Struktur-berechnung von GnRH-Antagonisten und GHRH-Analoga	75
Tabelle 13:	Übersicht der mittels Stufenelution an Sephadex LH-20 getrennten Tanninfraktionen	79
Tabelle 14:	Elutionsprogramme der Auftrennung der Tanninfraktionen TaF1 - TaF4 mittels semi-präparativer HPLC an einer RP-8-Säule	80
Tabelle 15:	Übersicht der mittels semi-präparativer HPLC getrennten Teilfraktionen der Tanninfraktionen TaF1 - TaF4	81

Tabelle 16:	Gradientenprogramm der Trennung und Reinigung von Methanolyseprodukten der Gallotanninmischung aus <i>Rhus chinensis</i> mittels semi-präparativer HPLC und Übersicht zu vereinigender Fraktionen.....	83
Tabelle 17:	Aufnahmeparameter der analytischen Gradienten-HPLC-Anlage zur Untersuchung von Tanninfraktionen und -spezies	85
Tabelle 18:	Optimierte Gradientenprogramme der analytischen HPLC an einer C-18-Säule zur Untersuchung verschiedener Tanninfraktionen.....	85
Tabelle 19:	Aufnahmeparameter der LC-MS/MS-Untersuchungen zu Molekülionmassen von Tanninfraktionen	87
Tabelle 20:	Parameter des Tochterionenscans zur näheren Charakterisierung einer Verbindung mit dem Masse/Ladungs-Verhältnis $m/z = 680$	88
Tabelle 21:	Parameter der im einzelnen durchgeführten Dialyseliberationsexperimente	95
Tabelle 22:	Mittelwerte und Standardabweichungen der ermittelten präexponentiellen Faktoren und Fluoreszenz-Lebensdauern von Teverelix und Cetorelix in 0,1 M Essigsäure (pH 3,0)	112
Tabelle 23:	Zusammenstellung statistischer Kenngrößen des Ergebnisses der 3D-Strukturberechnung von Cetorelix-Acetat in DMSO-d_6	140
Tabelle 24:	Zusammenstellung statistischer Kenngrößen des Ergebnisses der 3D-Strukturberechnung von Cetorelix-Acetat in DMSO-d_6/D₂O im Verhältnis 70/30 (v/v)	144
Tabelle 25:	Zusammenstellung statistischer Kenngrößen des Ergebnisses der 3D-Strukturberechnung von Cetorelix-Acetat in DMSO-d_6/D₂O im Verhältnis 45/55 (v/v)	147
Tabelle 26:	Zusammenstellung statistischer Kenngrößen des Ergebnisses der 3D-Strukturberechnung von Ozarelix-Acetat in DMSO-d_6 bei einer <i>trans</i>-Peptidbindung zwischen Ser⁴ & Tyr(Me)⁵	150
Tabelle 27:	Zusammenstellung statistischer Kenngrößen des Ergebnisses der 3D-Strukturberechnung von Ozarelix-Acetat in DMSO-d_6 bei einer <i>cis</i>-Peptidbindung zwischen Ser⁴ & Tyr(Me)⁵	150
Tabelle 28:	Zusammenstellung statistischer Kenngrößen des Ergebnisses der 3D-Strukturberechnung von Teverelix-Trifluoracetat in DMSO-d_6.....	153
Tabelle 29:	Zusammenstellung statistischer Kenngrößen des Ergebnisses der 3D-Strukturberechnung von Teverelix-Acetat in DMSO-d_6.....	153
Tabelle 30:	Zusammenstellung statistischer Kenngrößen des Ergebnisses der 3D-Strukturberechnung des GHRH-Analogons nach Peptidsyntheseverfahren 1 in DMSO-d_6	178
Tabelle 31:	Übersicht der ¹H-NMR-Ergebnisse für die Glukoseeinheit von 3GG.....	200
Tabelle 32:	Übersicht der ¹³C-Verschiebungen von 3GG, 4GG und PGG	203
Tabelle 33:	Übersicht der mittels Kongorottitration bestimmten Äquivalenzpunkte und Kongorotbindungskapazitäten der GnRH-Antagonisten Cetorelix, Ozarelix und Teverelix	231

Tabelle 34:	Hypothetische Verteilung der Sekundärstrukturelemente in einer parallelen β-Faltblatt-Struktur von Cetrorelixaggregaten auf die einzelnen Peptidbindungen der Sequenz	287
Tabelle A 1:	^1H-NMR-Verschiebungen von Cetrorelix-Acetat (10 mg/ml in DMSO-d₆)	381
Tabelle A 2:	^1H-NMR-Verschiebungen von Cetrorelix-Acetat (10 mg/ml in DMSO-d₆/D₂O (70/30))	382
Tabelle A 3:	^1H-NMR-Verschiebungen von Cetrorelix-Acetat (10 mg/ml in DMSO-d₆/D₂O (45/55))	383
Tabelle A 4:	^{13}C-NMR-Verschiebungen von Cetrorelix-Acetat (10 mg/ml in DMSO-d₆)	384
Tabelle A 5:	^{15}N-NMR-Verschiebungen von Cetrorelix-Acetat (10 mg/ml in DMSO-d₆)	385
Tabelle A 6:	^{15}N-NMR-Verschiebungen von Ozarelix-Acetat (10 mg/ml in DMSO-d₆)	385
Tabelle A 7:	^1H-NMR-Verschiebungen von Ozarelix-Acetat (10 mg/ml in DMSO-d₆)	386
Tabelle A 8:	^{13}C-NMR-Verschiebungen von Ozarelix-Acetat (10 mg/ml in DMSO-d₆)	387
Tabelle A 9:	^1H-NMR-Verschiebungen von Teverelix-Acetat (10 mg/ml in DMSO-d₆)	388
Tabelle A 10:	^1H-NMR-Verschiebungen von Teverelix-Trifluoracetat (10 mg/ml in DMSO-d₆)	389
Tabelle A 11:	^{13}C-NMR-Verschiebungen von Teverelix-Acetat (10 mg/ml in DMSO-d₆)	390
Tabelle A 12:	^{15}N-NMR-Verschiebungen von Teverelix-Acetat (10 mg/ml in DMSO-d₆)	391
Tabelle A 13:	Zusammenstellung statistischer Kenngrößen des Ergebnisses der 3D- Strukturberechnung der Strukturvariante 1 des GHRH-Analogons nach Peptidsyntheseverfahren 2 in DMSO-d₆	396
Tabelle A 14:	Zusammenstellung statistischer Kenngrößen des Ergebnisses der 3D- Strukturberechnung der Strukturvariante 2 des GHRH-Analogons nach Peptidsyntheseverfahren 2 in DMSO-d₆	397
Tabelle A 15:	Übersicht der Ergebnisse der ^1H-NMR-Spektroskopie der Glukoseeinheit von 4GG	397
Tabelle A 16:	Übersicht der Ergebnisse der ^1H-NMR-Spektroskopie der Glukoseeinheit von PGG.....	398

10 Anhang

10.1 Zuordnungstabellen der ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -NMR-Signale

10.1.1 Zuordnungstabellen für Cetrorelix

Tabelle A 1: ^1H -NMR-Verschiebungen von Cetrorelix-Acetat (10 mg/ml in DMSO- d_6)

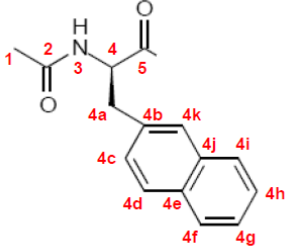
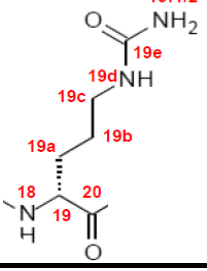
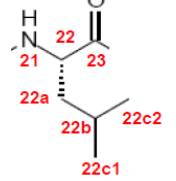
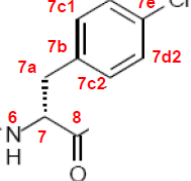
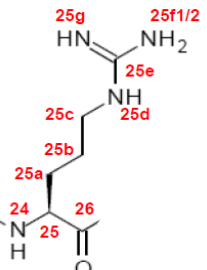
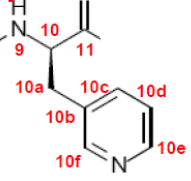
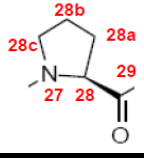
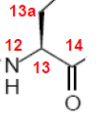
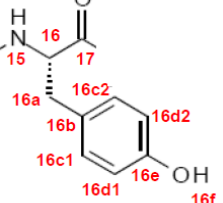
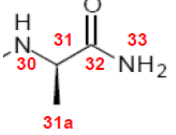
Aminosäurerest	Position	δ in ppm	Aminosäurerest	Position	δ in ppm
Ac-D-Nal(2) 	1	1,68	D-Cit 	18	8,12
	3	8,10		19	4,25
	4	4,56		19a	1,43/1,55
	4a	2,81/3,05		19b	1,23
	4c	7,37		19c	2,89
	4d	7,76		19d	5,97
	4f	7,84		19f1/2	5,46
	4g	7,45	Leu 	21	8,05
	4h	7,45		22	4,34
	4i	7,78		22a	1,38/1,48
	4k	7,67		22b	1,54
D-Phe(4Cl) 	6	8,20		22c1	0,80
	7	4,52		22c2	0,85
	7a	2,78/3,00	Arg 	24	8,19
	7c1/c2	7,21		25	4,42
D-Pal(3) 	7d1/d2	7,25		25a	1,50/1,69
	9	8,40		25b	1,50
	10	4,67		25c	3,04
	10a	2,87/3,01		25d	8,59
	10c	7,66		25f1/2	7,66
	10d	7,25		25g	-
	10e	8,38	Pro 	28	4,25
Ser 	10f	8,45		28a	1,79/2,02
	12	8,34		28b	1,79/1,97
	13	4,34		28c	3,53/3,73
Tyr 	13a	3,43/3,52	D-Ala-NH₂ 	30	8,33
	13b	-		31	4,10
	15	8,30		31a	1,21
	16	4,42		33	7,11/7,23
	16a	2,76/2,91			
	16c1/c2	7,02			
	16d1/d2	6,61			

Tabelle A 2: ¹H-NMR-Verschiebungen von Cetrorelix-Acetat (10 mg/ml in DMSO-d₆/D₂O (70/30))

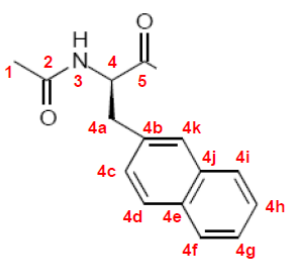
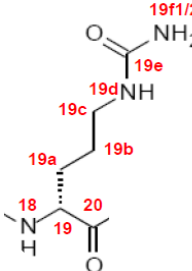
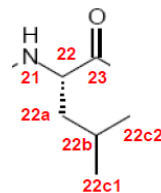
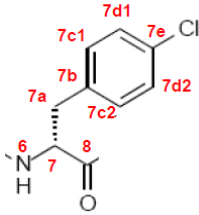
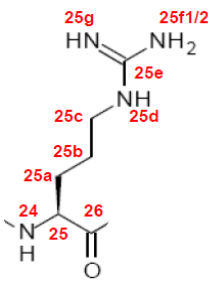
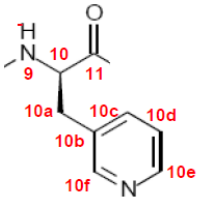
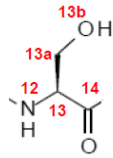
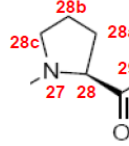
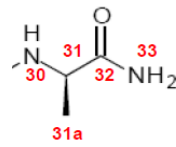
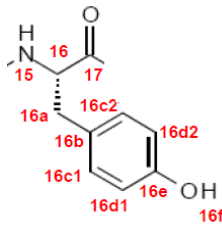
Aminosäurerest	Position	δ in ppm	Aminosäurerest	Position	δ in ppm
Ac-D-Nal(2) 	1	1,69	D-Cit 	18	-
	3	-		19	4,10
	4	4,49		19a	1,41/1,57
	4a	2,77/2,96		19b	1,14
	4c	7,24		19c	2,87
	4d	7,71		19d	5,48
	4f	7,80		19f1/2	5,28
	4g	7,43	Leu 	21	-
	4h	7,44		22	4,26
	4i	7,73		22a	1,39/1,46
	4k	7,55		22b	1,46
D-Phe(4Cl) 	6	-		22c1	0,71
	7	4,45		22c2	0,79
	7a	2,83/3,01	Arg 	24	-
	7c1/c2	7,13		25	4,27
D-Pal(3) 	7d1/d2	7,20		25a	1,33/1,56
	9	-		25b	1,35
	10	4,51		25c	2,96
	10a	2,87/3,01		25d	-
	10c	7,65		25f1/2	-
	10d	7,31		25g	-
Ser 	10e	8,34	Pro 	28	4,19
	10f	8,34		28a	1,72/2,05
	12	-		28b	1,77/1,88
	13	4,21	D-Ala-NH₂ 	28c	3,41/3,59
Tyr 	13a	3,39/3,54		30	-
	13b	-		31	4,07
	15	-		31a	1,21
	16	4,30		33	-
	16a	2,73/2,87			
	16c1/c2	6,95			
	16d1/d2	6,60			

Tabelle A 3: ^1H -NMR-Verschiebungen von Cetrorelix-Acetat (10 mg/ml in $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$ (45/55))

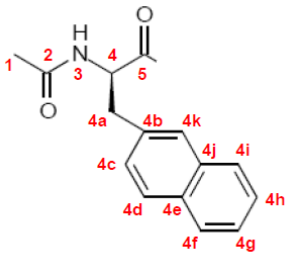
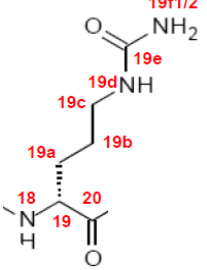
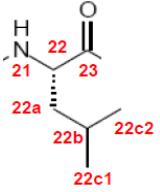
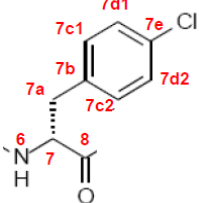
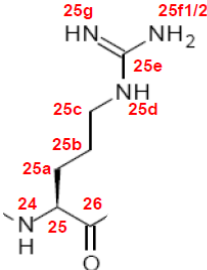
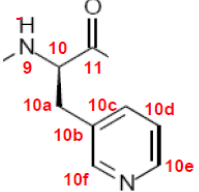
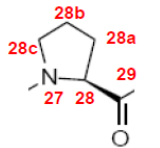
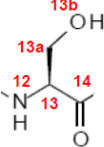
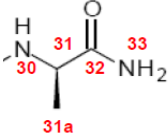
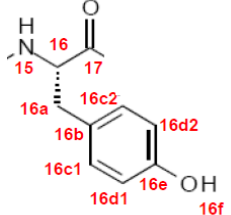
Aminosäurerest	Position	δ in ppm	Aminosäurerest	Position	δ in ppm
Ac-D-Nal(2) 	1	1,71	D-Cit 	18	-
	3	-		19	4,06
	4	4,38		19a	1,39/1,56
	4a	2,78/2,94		19b	1,10
	4c	7,18		19c	2,84
	4d	7,68		19d	-
	4f	7,78		19f1/2	-
	4g	7,41	Leu 	21	-
	4h	7,41		22	4,26
	4i	7,69		22a	1,39/1,45
	4k	7,49		22b	1,41
				22c1	0,69
D-Phe(4Cl) 	6	-		22c2	0,77
	7	4,45	Arg 	24	-
	7a	2,78/2,94		25	4,15
	7c1/c2	7,08		25a	1,17/1,47
	7d1/d2	7,18		25b	1,32
D-Pal(3) 	9	-		25c	2,89
	10	4,53		25d	-
	10a	2,87/2,95		25f1/2	-
	10c	7,61		25g	-
	10d	7,30	Pro 	28	4,17
	10e	8,31		28a	1,76/2,05
Ser 	10f	8,28		28b	1,76/1,88
	12	-	D-Ala-NH₂ 	28c	3,47/3,59
	13	4,16		30	-
	13a	3,33/3,53		31	4,05
Tyr 	13b	-		31a	1,21
	15	-		33	-
	16	4,27			
	16a	2,70/2,99			
	16c1/c2	6,90			
	16d1/d2	6,58			

Tabelle A 4: ^{13}C -NMR-Verschiebungen von Cetrorelix-Acetat (10 mg/ml in DMSO- d_6)

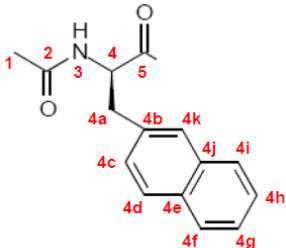
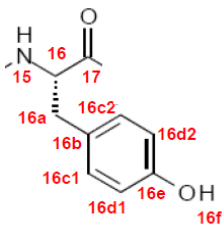
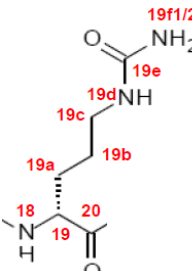
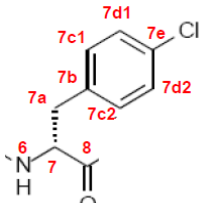
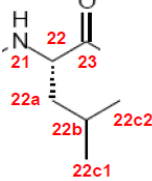
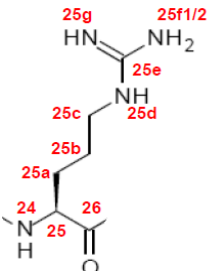
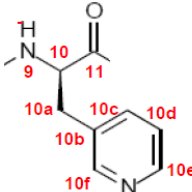
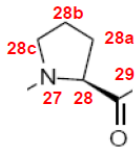
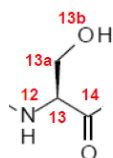
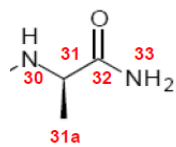
Aminosäurerest	Position	δ in ppm	Aminosäurerest	Position	δ in ppm
Ac-D-Nal(2) 	1	22,5	Tyr 	16	55,0
	2	169,0		16a	37,0
	4	54,0		16b	128,0
	4a	37,5		16c1/c2	130,0
	4b	136,0		16d1/d2	115,0
	4c	128,0		16e	156,0
	4d	127,5		17	171,0
	4e	132,0	D-Cit 	19	52,5
	4f	127,5		19a	29,5
	4g	125,5		19b	26,0
	4h	126,0		19c	38,5
	4i	127,5		19e	159,0
	4j	132,0		20	171,5
D-Phe(4Cl) 	4k	127,5	Leu 	22	51,0
	5	171,0		22a	41,0
	7	53,5		22b	24,0
	7a	37,0		22c1	21,0
	7b	137,0		22c2	23,0
	7c1/c2	131,0		23	170,0
	7d1/d2	128,0	Arg 	25	50,0
D-Pal(3) 	7e	-		25a	28,0
	8	171,0		25b	24,5
	10	53,5		25c	40,0
	10a	35,0		25e	-
	10b	147,0		26	170,5
	10c	137,0	Pro 	10d	123,0
	10e	147,5		28	60,0
	10f	150,5		28a	29,0
Ser 	11	170,5		28b	25,0
	13	54,5		28c	47,0
	13a	62,0	D-Ala-NH₂ 	29	171,5
	14	170,0		31	48,0
				31a	17,0
				32	174,0

Tabelle A 5: ^{15}N -NMR-Verschiebungen von Cetrorelix-Acetat (10 mg/ml in DMSO-d₆)

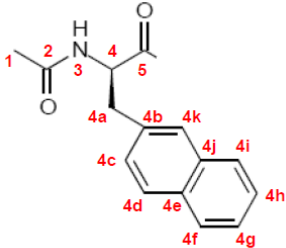
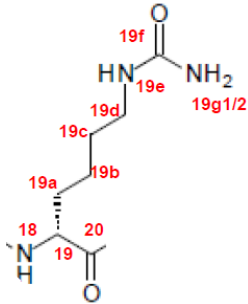
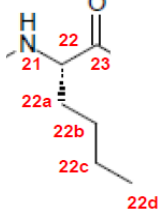
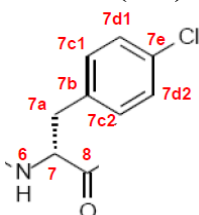
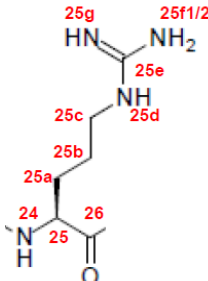
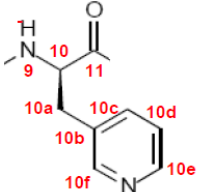
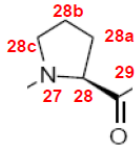
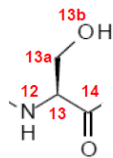
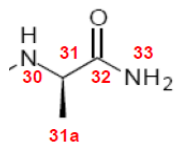
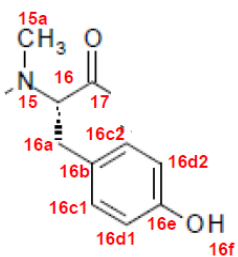
Aminosäurerest	Position	δ in ppm
Ac-D-Nal(2)	3	-255
D-Phe(4Cl)	6	-261
D-Pal(3)	9	-261
Ser	12	-263
Tyr	15	-257
D-Cit	18	-258
	19d	-294
	19f1/2	-303
Leu	21	-259
Arg	24	-258
	25g	-292
Pro	27	-
D-Ala-NH ₂	30	-254
	33	-275

10.1.2 Zuordnungstabellen für Ozarelix

Tabelle A 6: ^{15}N -NMR-Verschiebungen von Ozarelix-Acetat (10 mg/ml in DMSO-d₆)

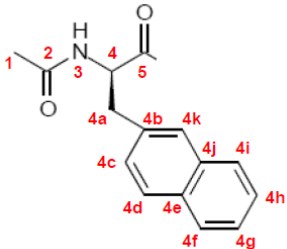
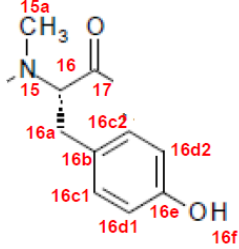
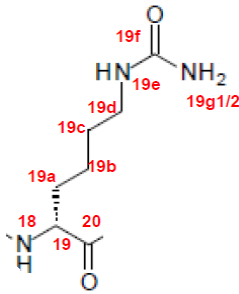
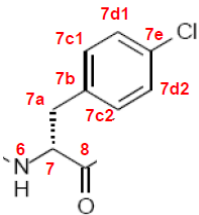
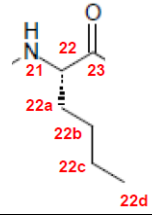
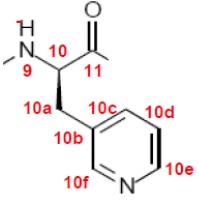
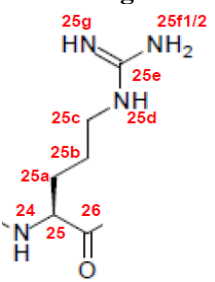
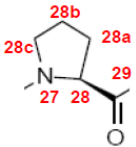
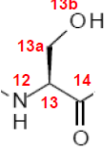
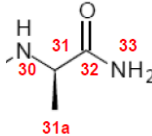
Aminosäurerest	Position	δ in ppm
Ac-D-Nal(2)	3	-255
D-Phe(4Cl)	6	-261
D-Pal(3)	9	-261
Ser	12	-261
NMe-Tyr	15	-
D-Hcit	18	-257
	19e	-293
	19g1/2	-303
Nle	21	-259
Arg	24	-257
	25d	-292
Pro	27	-
D-Ala-NH ₂	30	-254
	33	-275

Tabelle A 7: ¹H-NMR-Verschiebungen von Ozarelix-Acetat (10 mg/ml in DMSO-d₆)

Aminosäurerest	Position	δ in ppm	Aminosäurerest	Position	δ in ppm
Ac-D-Nal(2) 	1	1,68	D-Hcit 	18	7,88
	3	8,11		19	4,19
	4	4,56		19a	1,43/1,54
	4a	2,79/3,06		19b	1,07
	4c	7,38		19c	1,26
	4d	7,75		19d	2,87
	4f	7,84		19e	5,96 6,01
	4g	7,44		19g1/2	5,42 5,47
	4h	7,46	Nle 	21	8,04
	4i	7,78		22	4,26
	4k	7,67		22a	1,46/1,61
D-Phe(4Cl) 	6	8,18		22b	1,22 1,18
	7	4,51		22c	1,22 1,16
	7a	2,77/2,98		22d	0,82 0,77
	7c1/c2	7,19	Arg 	24	8,23
	7d1/d2	7,26		25	4,46
D-Pal(3) 	9	8,38		25a	1,54/1,68
	10	4,67 4,64		25b	1,51
	10a	2,84/3,01		25c	3,03
	10c	7,66		25d	8,69
	10d	7,24		25f1/2	-
	10e	8,37		25g	-
	10f	8,44	Pro 	28	4,26
Ser 	12	8,36		28a	1,79/2,01
	13	4,81 4,59		28b	1,81/1,96
	13a	3,43/3,51		28c	3,54/3,74 3,54/3,71
	13b	-	D-Ala-NH₂ 	30	8,29
NMe-Tyr 	15a	2,98 2,76		31	4,10
	16	5,12 4,91		31a	1,20
	16a	2,65/3,11 2,72/3,10		33	7,11/7,22
	16c1/c2	6,96 7,02			
	16d1/d2	6,59 6,66			

* rot dargestellte Einträge repräsentieren abweichende Werte für die parallel auftretende Peptidspezies mit einer *cis*-Peptidbindung zwischen Ser⁴ und NMe-Tyr⁵

Tabelle A 8: ^{13}C -NMR-Verschiebungen von Ozarelix-Acetat (10 mg/ml in DMSO-d₆)

Aminosäurerest	Position	δ in ppm	Aminosäurerest	Position	δ in ppm
Ac-D-Nal(2) 	1	22,5	NMe-Tyr 	15a	31,5 29,0
	2	169,0		16	57,0 61,0
	4	53,5		16a	33,0 34,0
	4a	37,5		16b	127,5
	4b	136,0		16c1/c2	130,0 130,5
	4c	127,5		16d1/d2	115,0
	4d	127,5		16e	156,0
	4e	132,0		17	169,5
	4f	127,5	D-Hcit 	19	53,0
	4g	125,5		19a	31,5
	4h	126,0		19b	22,5
	4i	127,5		19c	30,0
	4j	132,0		19d	39,0
	4k	127,5		19f	159,0
	5	171,0		20	171,0
D-Phe(4Cl) 	7	53,5	Nle 	22	52,0
	7a	37,0		22a	32,0
	7b	137,0		22b	22,0
	7c1/c2	131,0		22c	27,5
	7d1/d2	128,0		22d	14,0
	7e	-		23	171,0
D-Pal(3) 	8	170,5	Arg 	25	50,0
	10	53,0		25a	28,0
	10a	35,5		25b	24,5
	10b	133,0		25c	40,5
	10c	137,0		25e	-
	10d	123,5		26	170,0
	10e	147,5	Pro 	28	60,0
	10f	150,5		28a	29,0
Ser 	11	171,0		28b	25,0
	13	51,0 51,5		28c	47,0
	13a	62,0		29	171,0
	14	170,5	D-Ala-NH₂ 	31	48,0
				31a	18,0
				32	174,0

* rot dargestellte Einträge repräsentieren abweichende Werte für die parallel auftretende Peptidspezies mit einer *cis*-Peptidbindung zwischen Ser⁴ und NMe-Tyr⁵

10.1.3 Zuordnungstabellen für Teverelix

Tabelle A 9: ¹H-NMR-Verschiebungen von Teverelix-Acetat (10 mg/ml in DMSO-d₆)

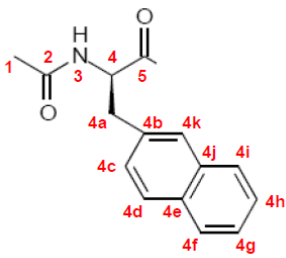
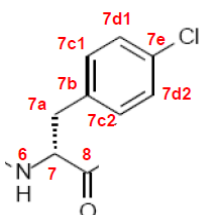
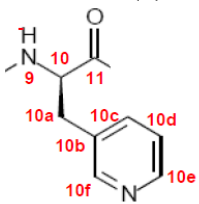
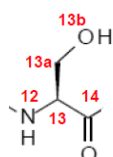
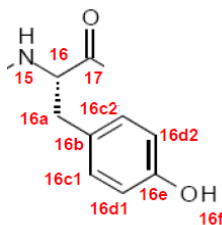
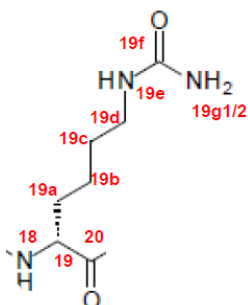
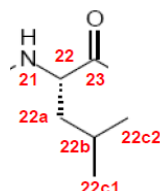
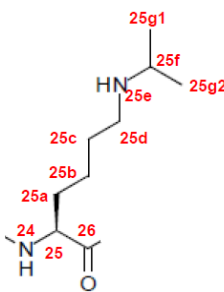
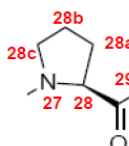
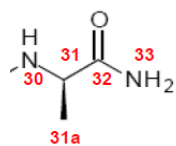
Aminosäurerest	Position	δ in ppm
Ac-D-Nal(2) 	1	1,68
	3	8,09
	4	4,58
	4a	2,79/3,03
	4c	7,36
	4d	7,75
	4f	7,82
	4g	7,44
	4h	7,46
	4i	7,77
	4k	7,66
D-Phe(4Cl) 	6	8,18
	7	4,51
	7a	2,76/3,00
	7c1/c2	7,21
	7d1/d2	7,26
D-Pal(3) 	9	8,35
	10	4,67
	10a	2,85/3,01
	10c	7,66
	10d	7,24
	10e	8,38
	10f	8,44
Ser 	12	8,30
	13	4,33
	13a	3,38/3,52
	13b	-
Tyr 	15	8,22
	16	4,41
	16a	2,75/2,89
	16c1/c2	6,99
	16d1/d2	6,60
D-Hcit 	18	7,96
	19	4,23
	19a	1,43/1,52
	19b	1,08
	19c	1,27
	19d	2,86
	19e	5,92
	19g1/2	5,42
Leu 	21	8,04
	22	4,33
	22a	1,36/1,45
	22b	1,53
	22c1	0,80
	22c2	0,84
Lys(iPr) 	24	8,04
	25	4,36
	25a	1,45/1,62
	25b	1,28
	25c	1,39
	25d	2,51
	25e	-
	25f	2,79
	25g1/g2	0,99
Pro 	28	4,25
	28a	1,79/2,01
	28b	1,81/1,96
	28c	3,49/3,76
D-Ala-NH₂ 	30	8,22
	31	4,11
	31a	1,20
	33	7,04/7,21

Tabelle A 10: ^1H -NMR-Verschiebungen von Teverelix-Trifluoracetat (10 mg/ml in DMSO- d_6)

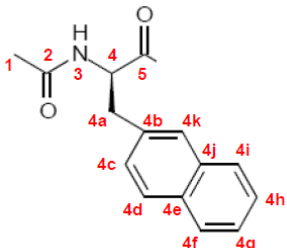
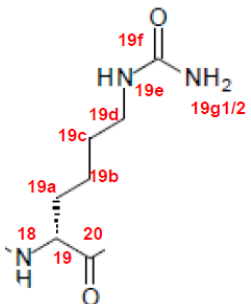
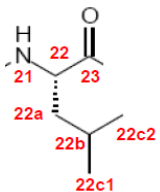
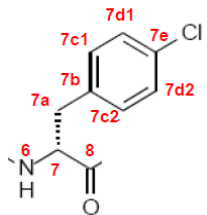
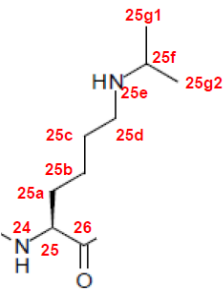
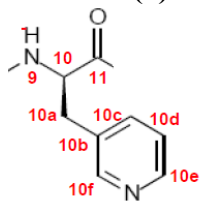
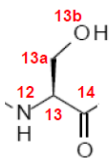
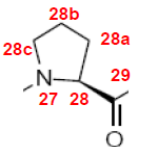
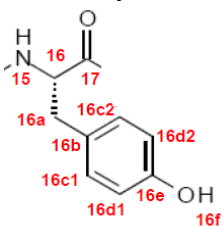
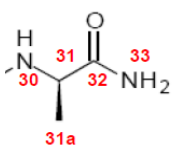
Aminosäurerest	Position	δ in ppm	Aminosäurerest	Position	δ in ppm
Ac-D-Nal(2) 	1	1,68	D-Hcit 	18	7,90
	3	8,09		19	4,24
	4	4,55		19a	1,43/1,54
	4a	2,79/3,05		19b	1,07
	4c	7,36		19c	1,27
	4d	7,75		19d	2,87
	4f	7,84		19e	5,92
	4g	7,44		19g1/2	5,42
	4h	7,46	Leu 	21	8,05
	4i	7,76		22	4,35
	4k	7,66		22a	1,36/1,45
D-Phe(4Cl) 	6	8,18		22b	1,54
	7	4,50		22c1	0,80
	7a	2,79/3,00		22c2	0,85
	7c1/c2	7,21	Lys(iPr) 	24	8,14
	7d1/d2	7,26		25	4,36
D-Pal(3) 	9	8,36		25a	1,54/1,64
	10	4,72		25b	1,33
	10a	2,95/3,11		25c	1,53
	10c	8,06		25d	2,81
	10d	7,60		25e	8,23
	10e	8,59		25f	3,25
	10f	8,62		25g1/g2	1,18
Ser 	12	8,27	Pro 	28	4,25
	13	4,34		28a	1,79/2,04
	13a	3,45/3,53		28b	1,80/1,95
	13b	-		28c	3,49/3,78
Tyr 	15	8,15	D-Ala-NH₂ 	30	8,30
	16	4,42		31	4,10
	16a	2,75/2,91		31a	1,20
	16c1/c2	7,01		33	7,05/7,13
	16d1/d2	6,60			

Tabelle A 11: ^{13}C -NMR-Verschiebungen von Teverelix-Acetat (10 mg/ml in DMSO-d₆)

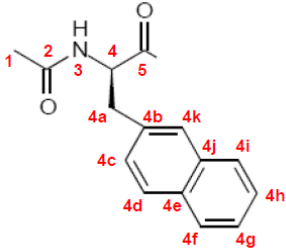
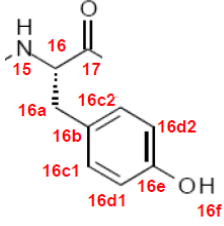
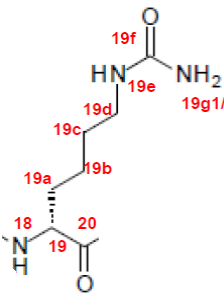
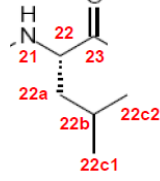
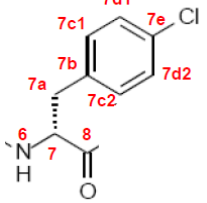
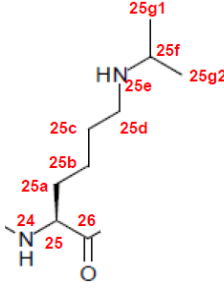
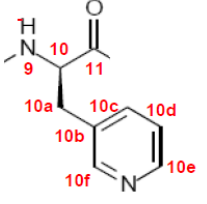
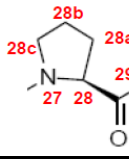
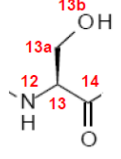
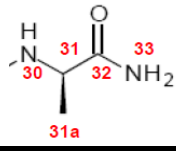
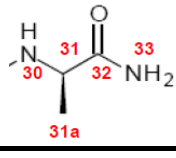
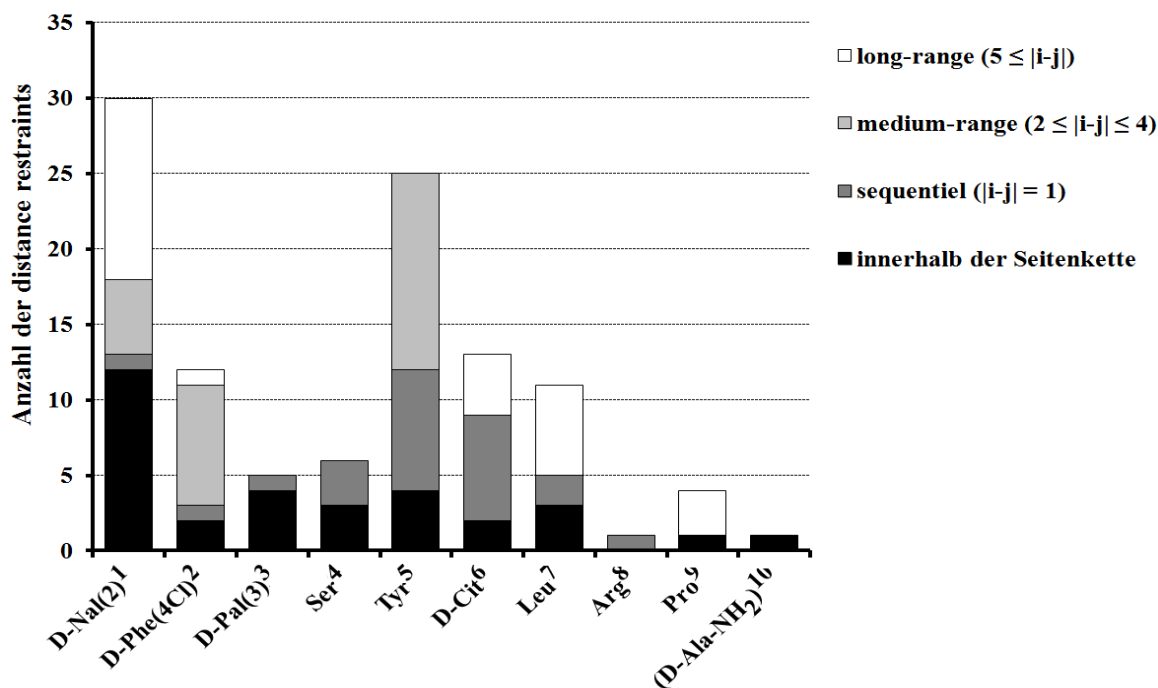
Aminosäurerest	Position	δ in ppm	Aminosäurerest	Position	δ in ppm
Ac-D-Nal(2) 	1	22,5	Tyr 	16	55,0
	2	169,0		16a	37,0
	4	54,0		16b	128,0
	4a	37,5		16c1/c2	130,0
	4b	136,0		16d1/d2	115,0
	4c	128,0		16e	156,0
	4d	128,0		17	171,0
	4e	132,0	D-Hcit 	19	52,5
	4f	128,0		19a	32,0
	4g	125,5		19b	22,5
	4h	126,0		19c	30,0
	4i	128,0		19d	39,0
	4j	132,0		19f	159,0
	4k	128,0		20	171,0
	5	171,0	Leu 	22	50,5
D-Phe(4Cl) 	7	53,5		22a	40,5
	7a	37,0		22b	24,0
	7b	137,0		22c1	21,0
	7c1/c2	131,5		22c2	23,0
	7d1/d2	128,0		23	171,0
	7e	-	Lys(iPr) 	25	50,5
	8	170,5		25a	31,0
D-Pal(3) 	10	53,5		25b	22,5
	10a	35,0		25c	28,5
	10b	133,0		25d	45,5
	10c	137,0		25f	48,5
	10d	123,0		25g1/g2	21,5
	10e	147,5		26	170,5
	10f	150,5	Pro 	28	60,0
Ser 	11	170,0		28a	29,0
	13	54,5		28b	25,0
	13a	61,5		28c	47,0
D-Ala-NH₂ 	14	170,0		29	171,0
			D-Ala-NH₂ 	31	48,0
				31a	17,5
				32	174,0

Tabelle A 12: ^{15}N -NMR-Verschiebungen von Teverelix-Acetat (10 mg/ml in DMSO- d_6)

Aminosäurerest	Position	δ in ppm
Ac-D-Nal(2)	3	-255
D-Phe(4Cl)	6	-261
D-Pal(3)	9	-261
Ser	12	-262
Tyr	15	-253
D-Hcit	18	-259
	19e	-293
	19g1/2	-303
Leu	21	-259
Lys(iPr)	24	-259
	25e	-
Pro	27	-
D-Ala-NH ₂	30	-255
	33	-275

10.2 Verteilung und Kontakt-Übersichten von NOE restraints

10.2.1 Verteilung der *NOE distance restraints* für Cetrorelix-Acetat in DMSO- d_6 /D₂O (45/55 (v/v))

Abb. A 1: Verteilung der NOE restraints der 3D-Strukturberechnung von Cetrorelix-Acetat in DMSO- d_6 /D₂O (45/55 (v/v)) auf die einzelnen Aminosäure-Reste des Peptides

(D-Ala-NH ₂) ¹⁰										1
Pro ⁹	> 2								1	
Arg ⁸							1			
Leu ⁷	> 2	1				1	> 2	1		
D-Cit ⁶	> 2				> 2	2	1			
Tyr ⁵	> 2	> 2		2	> 2	> 2				
Ser ⁴			1	> 2	2					
D-Pal(3) ³			> 2	1						
D-Phe(4Cl) ²	1	2			> 2		1			
Ac-D-Nal(2) ¹	> 2	1			> 2	> 2	> 2		< 2	
	Ac-D-Nal(2) ¹	D-Phe(4Cl) ²	D-Pal(3) ³	Ser ⁴	Tyr ⁵	D-Cit ⁶	Leu ⁷	Arg ⁸	Pro ⁹	(D-Ala-NH ₂) ¹⁰

Abb. A 2: NOE-Kontaktübersicht für die 3D-Strukturberechnung von Cetrorelix-Acetat in DMSO-d₆/D₂O im Verhältnis 45/55 (v/v)

10.2.2 Verteilung der *NOE distance restraints* für Ozarelix-Acetat in DMSO-d₆ bei einer *trans*-Peptidbindung zwischen Ser⁴ & Tyr(Me)⁵

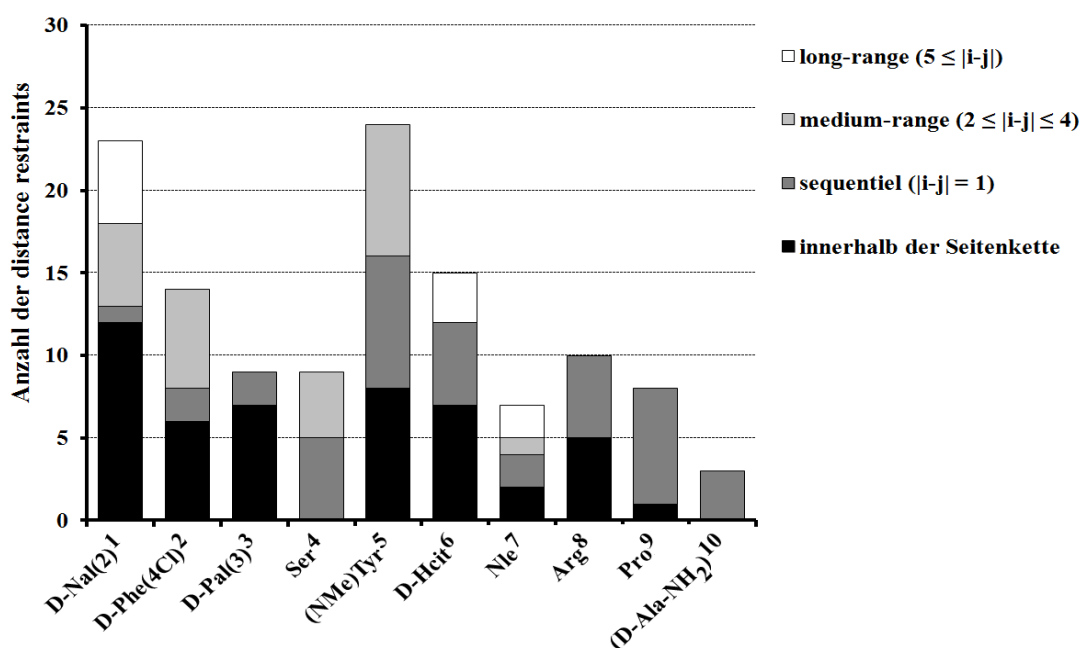


Abb. A 3: Verteilung der NOE restraints der 3D-Strukturberechnung von Ozarelix-Acetat in DMSO-d₆ bei einer *trans*-Peptidbindung auf die einzelnen Aminosäure-Reste des Peptides

(D-Ala-NH ₂) ¹⁰									> 2	
Pro ⁹								> 2	1	> 2
Arg ⁸							1	> 2	> 2	
Nle ⁷	2				1	1	2	1		
D-Hcit ⁶	> 2				> 2	> 2	1			
NMe-Tyr ⁵	> 2	> 2		> 2	> 2	> 2	1			
Ser ⁴	1	> 2	1		> 2					
D-Pal(3) ³		1	> 2	1						
D-Phe(4Cl) ²	1	> 2	1	> 2	> 2					
Ac-D-Nal(2) ¹	> 2	1		1	> 2	> 2	2			
	Ac-D-Nal(2) ¹	D-Phe(4Cl) ²	D-Pal(3) ³	Ser ⁴	NMe-Tyr ⁵	D-Hcit ⁶	Nle ⁷	Arg ⁸	Pro ⁹	(D-Ala-NH ₂) ¹⁰

Abb. A 4: NOE-Kontaktübersicht für die 3D-Strukturberechnung von Ozarelix-Acetat in DMSO-d₆ bei einer *trans*-Peptidbindung zwischen Ser⁴ und Tyr(Me)⁵

10.2.3 Verteilung der *NOE distance restraints* für Ozarelix-Acetat in DMSO-d₆ bei einer *cis*-Peptidbindung zwischen Ser⁴ & Tyr(Me)⁵

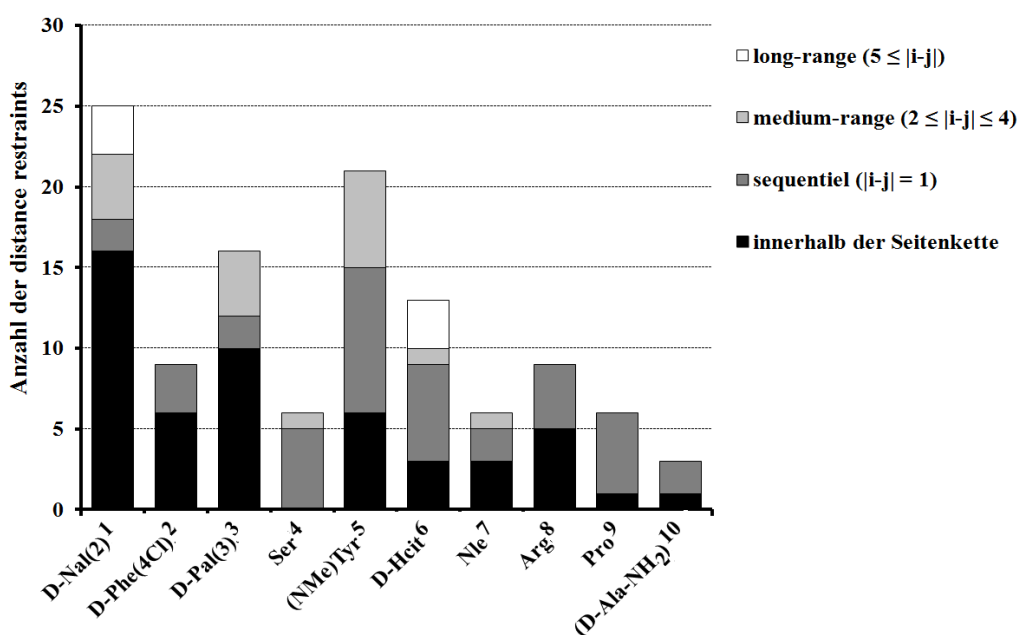


Abb. A 5: Verteilung der NOE restraints der 3D-Strukturberechnung von Ozarelix-Acetat in DMSO-d₆ bei einer *cis*-Peptidbindung auf die einzelnen Aminosäure-Reste des Peptides

(D-Ala-NH ₂) ¹⁰								2	1	
Pro ⁹							> 2	1	2	
Arg ⁸						1	> 2	> 2		
Nle ⁷				1	1	> 2	1			
D-Hcit ⁶	> 2		1		> 2	> 2	1			
NMe-Tyr ⁵	> 2		2	> 2	> 2	> 2	1			
Ser ⁴	1		1		> 2					
D-Pal(3) ³	1	1	> 2	1	2	1				
D-Phe(4Cl) ²	2	> 2	1							
Ac-D-Nal(2) ¹	> 2	2	1	1	> 2	> 2				
	Ac-D-Nal(2) ¹	D-Phe(4Cl) ²	D-Pal(3) ³	Ser ⁴	NMe-Tyr ⁵	D-Hcit ⁶	Nle ⁷	Arg ⁸	Pro ⁹	(D-Ala-NH ₂) ¹⁰

Abb. A 6: NOE-Kontaktübersicht für die 3D-Strukturberechnung von Ozarelix-Acetat in DMSO-d₆ bei einer *cis*-Peptidbindung zwischen Ser⁴ und Tyr(Me)⁵

10.2.4 Verteilung der *NOE distance restraints* für Teverelix-Trifluoracetat in DMSO-d₆

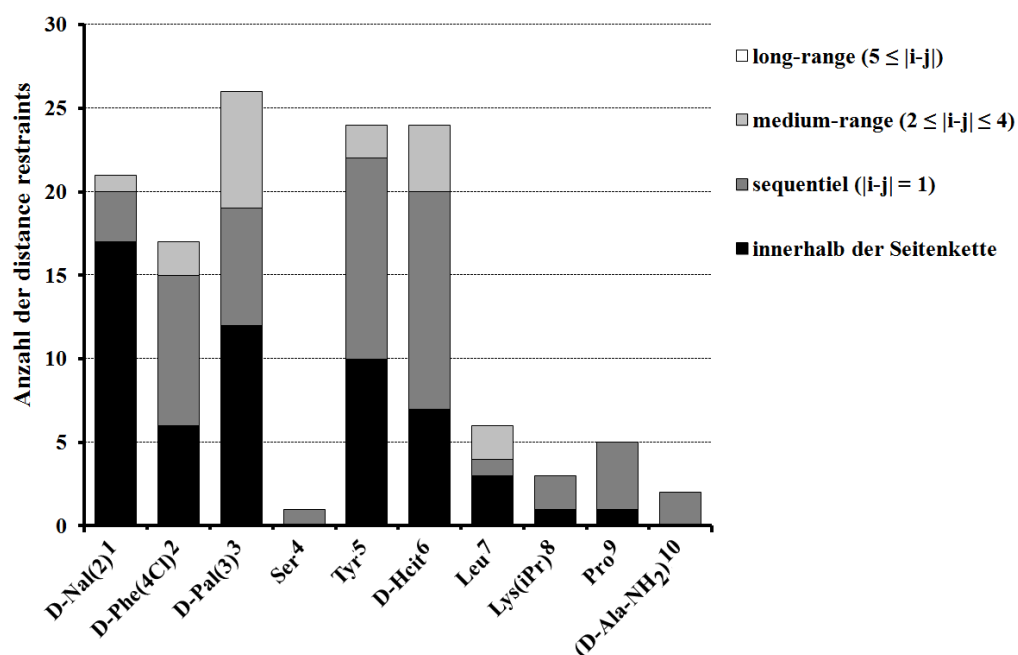
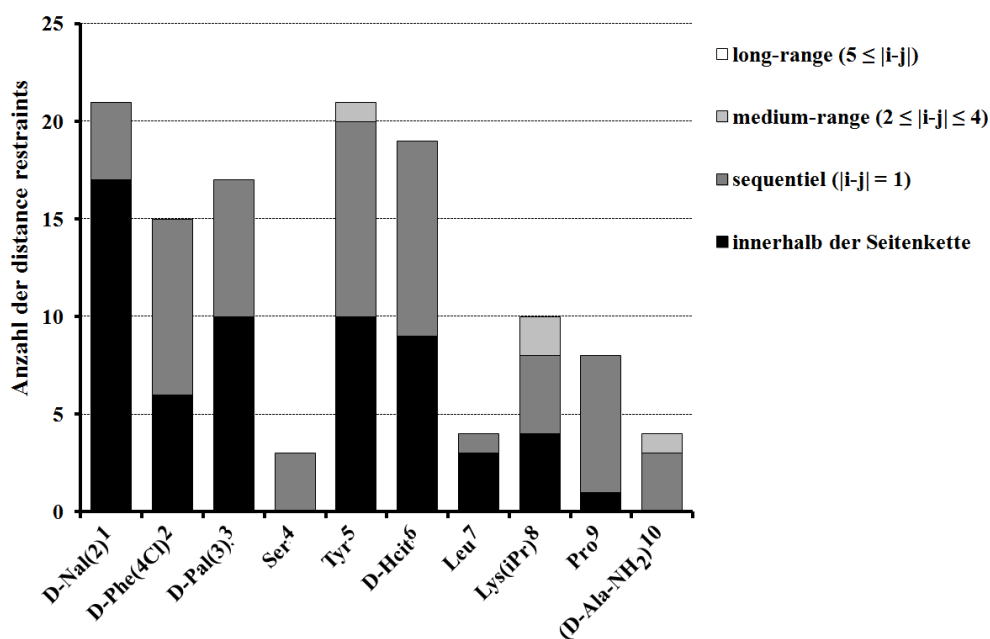


Abb. A 7: Verteilung der NOE restraints der 3D-Strukturberechnung von Teverelix-TFA in DMSO-d₆

(D-Ala-NH ₂) ¹⁰								2		
Pro ⁹								2	1	2
Lys(iPr) ⁸								1	2	
Leu ⁷			2			1	> 2			
D-Hcit ⁶		2	2		> 2	> 2	1			
Tyr ⁵			2		> 2	> 2				
Ser ⁴			1							
D-Pal(3) ³	1	> 2	> 2	1	2	2	2			
D-Phe(4Cl) ²	> 2	> 2	> 2			2				
Ac-D-Nal(2) ¹	> 2	> 2	1							
Ac-D-Nal(2) ¹		D-Phe(4Cl) ²	D-Pal(3) ³	Ser ⁴	Tyr ⁵	D-Hcit ⁶	Leu ⁷	Lys(iPr) ⁸	Pro ⁹	(D-Ala-NH ₂) ¹⁰

Abb. A 8: NOE-Kontaktübersicht für die 3D-Strukturberechnung von Teverelix-TFA in DMSO-d₆

10.2.5 Verteilung der *NOE distance restraints* für Teverelix-Acetat in DMSO-d₆

Abb. A 9: Verteilung der NOE restraints der Strukturberechnung von Teverelix-Acetat in DMSO-d₆

(D-Ala-NH ₂) ¹⁰							1	> 2		
Pro ⁹							> 2	1	> 2	
Lys(iPr) ⁸				1			> 2	> 2	1	
Leu ⁷					1	> 2				
D-Hcit ⁶				> 2	> 2	1				
Tyr ⁵			1	> 2	> 2		1			
Ser ⁴		2		1						
D-Pal(3) ³	> 2	> 2	2							
D-Phe(4Cl) ²	> 2	> 2	> 2							
Ac-D-Nal(2) ¹	> 2	> 2								
	Ac-D-Nal(2) ¹	D-Phe(4Cl) ²	D-Pal(3) ³	Ser ⁴	Tyr ⁵	D-Hcit ⁶	Leu ⁷	Lys(iPr) ⁸	Pro ⁹	(D-Ala-NH ₂) ¹⁰

Abb. A 10: NOE-Kontaktübersicht für die 3D-Strukturberechnung von Teverelix-Acetat in DMSO-d₆

10.3 Statistische Werte der 3D-Strukturberechnung des GHRH-Analogons nach Peptidsyntheseverfahren 2

Tabelle A 13: Zusammenstellung statistischer Kenngrößen des Ergebnisses der 3D-Strukturberechnung der Strukturvariante 1 des GHRH-Analogons nach Peptidsyntheseverfahren 2 in DMSO-d₆

Parameter	Wert
Anzahl finaler Strukturmodelle	20
Target function [Å ²]	1915,85 ± 0,27
Backbone RMSD [Å]	4,33 ± 1,12
Heavy atom RMSD [Å]	5,72 ± 1,29
Anzahl zugeordneter Kreuzpeaks	261

Parameter	Wert
Anzahl NOE restraints	105
- davon innerhalb derselben Seitenkette	31 (29,52 %)
- davon sequentiell (i-j = 1)	51 (48,57 %)
- davon medium-range (2 ≤ i-j ≤ 4)	5 (4,76 %)
- davon long-range (5 ≤ i-j)	18 (17,14 %)

Tabelle A 14: Zusammenstellung statistischer Kenngrößen des Ergebnisses der 3D-Strukturberechnung der Strukturvariante 2 des GHRH-Analogons nach Peptidsyntheseverfahren 2 in DMSO-d₆

Parameter	Wert	Parameter	Wert
Anzahl finaler Strukturmodelle	20	Anzahl NOE restraints	106
Target function [\AA^2]	$1916,31 \pm 0,22$	- davon innerhalb derselben Seitenkette	37 (34,91 %)
Backbone RMSD [\AA]	$4,49 \pm 0,99$	- davon sequentiell ($ i-j = 1$)	52 (49,06 %)
Heavy atom RMSD [\AA]	$6,05 \pm 1,19$	- davon medium-range ($2 \leq i-j \leq 4$)	5 (4,72 %)
Anzahl zugeordneter Kreuzpeaks	279	- davon long-range ($5 \leq i-j $)	12 (11,32 %)

10.4 Zuordnungstabellen für die ^1H -NMR-Spektren der Glukoseeinheiten von 4GG und PGG

Tabelle A 15: Übersicht der Ergebnisse der ^1H -NMR-Spektroskopie der Glukoseeinheit von 4GG

zugeordneter ^1H -Kern	δ in ppm	Peakintensität	Multiplett*	Kopplungskonstanten
H(1)	6,13	1,00	d	$^3J(\text{H}(1)-\text{H}(2)) = 8,3 \text{ Hz}$
H(2)	5,27	1,12	dd	$^3J(\text{H}(1)-\text{H}(2)) = 8,3 \text{ Hz}$ $^3J(\text{H}(2)-\text{H}(3)) = 10,0 \text{ Hz}$
H(3)	5,52	1,07	t	$^3J(\text{H}(2)-\text{H}(3)) = 9,5 \text{ Hz}$ $^3J(\text{H}(3)-\text{H}(4)) = 9,5 \text{ Hz}$
H(4)	3,81	1,08	td	$^3J(\text{H}(3)-\text{H}(4)) = 9,6 \text{ Hz}$ $^3J(\text{H}(4)-\text{H}(5)) = 9,6 \text{ Hz}$ $^3J(\text{H}(4)-\text{OH}(4)) = 5,6 \text{ Hz}$
OH(4)	5,89	1,08	d	$^3J(\text{H}(4)-\text{OH}(4)) = 6,1 \text{ Hz}$
H(5)	4,08	1,07	ddd	$^3J(\text{H}(4)-\text{H}(5)) = 9,8 \text{ Hz}$ $^3J(\text{H}(5)-\text{H}(6_1)) = 4,3 \text{ Hz}$ $^3J(\text{H}(5)-\text{H}(6_2)) = 2,2 \text{ Hz}$
H(6 ₁)	4,38	1,09	dd	$^3J(\text{H}(5)-\text{H}(6_1)) = 4,6 \text{ Hz}$ $^2J(\text{H}(6_1)-\text{H}(6_2)) = 12,4 \text{ Hz}$
H(6 ₂)	4,44	1,12	dd	$^3J(\text{H}(5)-\text{H}(6_2)) = 1,9 \text{ Hz}$ $^2J(\text{H}(6_1)-\text{H}(6_2)) = 12,6 \text{ Hz}$

* Multiplettnotation (d: Dublett; dd: Dublett eines Dubletts; ddd: Dublett eines Dubletts eines Dubletts; t: Triplet; td: Triplet eines Dubletts)

Tabelle A 16: Übersicht der Ergebnisse der ^1H -NMR-Spektroskopie der Glukoseeinheit von PGG

zugeordneter ^1H -Kern	δ in ppm	Peakintensität	Multiplett*	Kopplungskonstanten
H(1)	6,37	1,00	d	$^3J(\text{H}(1)-\text{H}(2)) = 8,3 \text{ Hz}$
H(2)	5,41	2,21 (mit H(4))	dd	$^3J(\text{H}(1)-\text{H}(2)) = 8,4 \text{ Hz}$ $^3J(\text{H}(2)-\text{H}(3)) = 9,7 \text{ Hz}$
H(3)	5,95	1,03	t	$^3J(\text{H}(2)-\text{H}(3)) = 9,7 \text{ Hz}$ $^3J(\text{H}(3)-\text{H}(4)) = 9,7 \text{ Hz}$
H(4)	5,44	2,21 (mit H(2))	t	$^3J(\text{H}(3)-\text{H}(4)) = 9,7 \text{ Hz}$ $^3J(\text{H}(4)-\text{H}(5)) = 9,7 \text{ Hz}$
H(5)	4,59	1,17	dt	$^3J(\text{H}(4)-\text{H}(5)) = 9,9 \text{ Hz}$ $^3J(\text{H}(5)-\text{H}(6_1)) = 3,1 \text{ Hz}$ $^3J(\text{H}(5)-\text{H}(6_2)) = 3,1 \text{ Hz}$
H(6 ₁)	4,30	2,22	br s	
H(6 ₂)				

* Multiplettnotation (d: Dublett; dd: Dublett eines Dubletts; dt: Dublett eines Triplets; t: Triplett; br s: breites Singulett)

10.5 ATR-FTIR-Spektren von Teverelix-Komplexen mit Tanninfraktionen

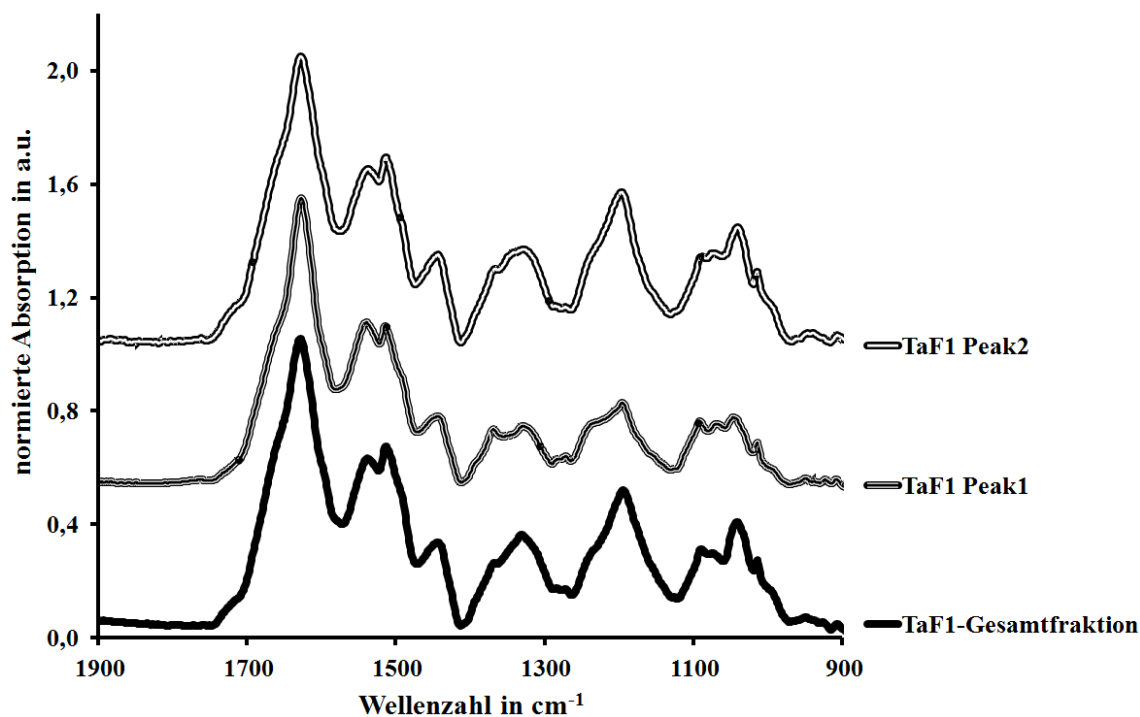


Abb. A 11: ATR-FTIR-Spektren von Teverelix-Komplexen mit Tanninfraktion TaF1 und deren Teilfraktionen

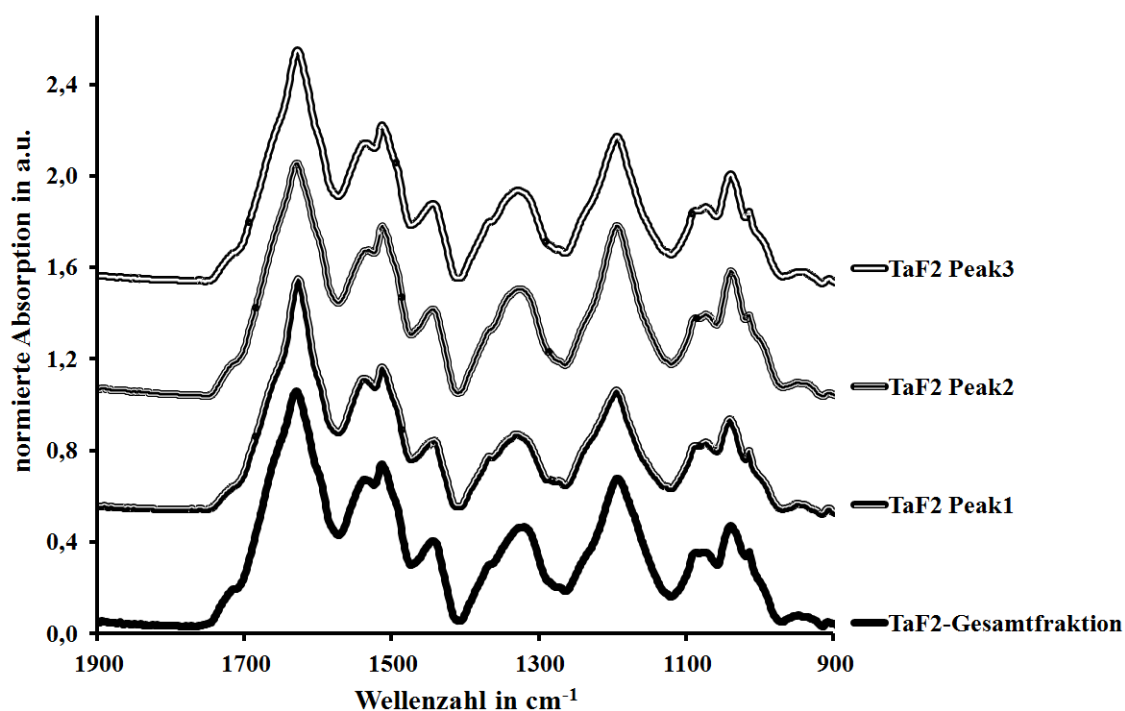


Abb. A 12: ATR-FTIR-Spektren von Teverelix-Komplexen mit Tanninfraktion TaF2 und deren Teilfraktionen

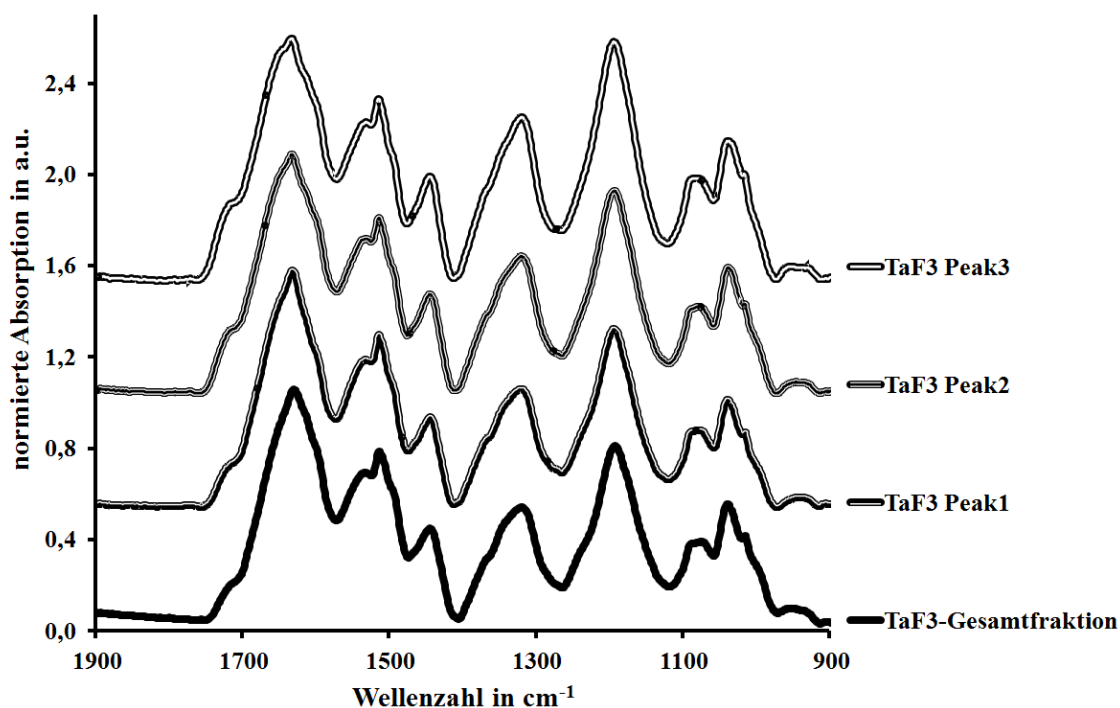


Abb. A 13: ATR-FTIR-Spektren von Teverelix-Komplexen mit Tanninfraktion TaF3 und deren Teilfraktionen

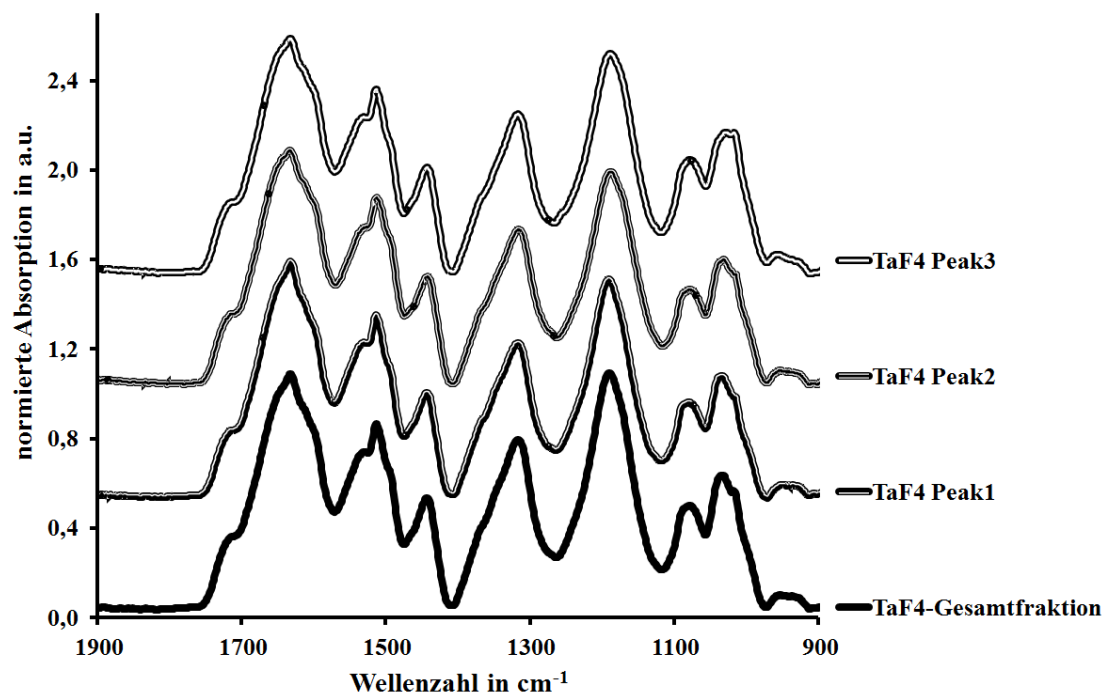


Abb. A 14: ATR-FTIR-Spektren von Teverelix-Komplexen mit Tanninfraktion TaF4 und deren Teilfraktionen

Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Technischen Universität Dresden unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Karl-Heinz van Pée und Herrn Dr. rer. nat. Wolfgang Naumann an der Professur für Allgemeine Biochemie angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Weiterhin versichere ich, dass keine früheren erfolglosen Promotionsverfahren stattgefunden haben.

Ich erkenne die Promotionsordnung der Technischen Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften vom 23.02.2011 in allen Teilen an.

Ort, Datum

Unterschrift